

PCT
WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)



| | | | | | | | | | | | | | |
|---|---------------------------|---|----|---------------|--------------------------|----|---------------|-------------------------|----|---------------|---------------------------|----|---|
| <p>(51) Internationale Patentklassifikation ⁵ : G01N 33/574, C12P 21/08, C07K 15/28, C12Q 1/68, G01N 33/577, A61K 49/00</p> | A1 | <p>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 95/00851</p> <p>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 5. Januar 1995 (05.01.95)</p> | | | | | | | | | | | |
| <p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP94/01952</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 15. Juni 1994 (15.06.94)</p> <p>(30) Prioritätsdaten:</p> <table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 30%;">P 43 20 623.9</td> <td style="width: 30%;">22. Juni 1993 (22.06.93)</td> <td style="width: 40%;">DE</td> </tr> <tr> <td>P 43 20 624.7</td> <td>22. Juni 1993 (22.06.93)</td> <td>DE</td> </tr> <tr> <td>P 43 21 944.6</td> <td>2. Juli 1993 (02.07.93)</td> <td>DE</td> </tr> <tr> <td>P 44 14 787.2</td> <td>28. April 1994 (28.04.94)</td> <td>DE</td> </tr> </table> <p>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH [DE/DE]; Postfach 200, D-55216 Ingelheim an Rhein (DE). KERNFORSCHUNGSZENTRUM KARLSRUHE GMBH [DE/DE]; D-76021 Karlsruhe (DE).</p> <p>(72) Erfinder; und</p> <p>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): PONTA, Helmut [DE/DE]; Blankenlocher Strasse 12, D-76351 Linkenheim-Hochstetten (DE). HEIDER, Karl-Heinz [DE/DE]; Renschstrasse 6, D- 76337 Waldbronn-Reichenbach (DE). HERRLICH, Peter [DE/DE]; Vogelsang 8, D-76229 Karlsruhe (DE). PALS, Steven, T. [NL/NL]; Hemonylaan 8, NL-1074 BE Amster- dam (NL). DALL, Peter [DE/DE]; Fichtestrasse 8, D-76297 Stutensee (DE).</p> | P 43 20 623.9 | 22. Juni 1993 (22.06.93) | DE | P 43 20 624.7 | 22. Juni 1993 (22.06.93) | DE | P 43 21 944.6 | 2. Juli 1993 (02.07.93) | DE | P 44 14 787.2 | 28. April 1994 (28.04.94) | DE | <p>(74) Gemeinsamer Vertreter: BOEHRINGER INGELHEIM IN- TERNATIONAL GMBH; Postfach 200, D-55216 Ingelheim am Rhein (DE).</p> <p>(81) Bestimmungsstaaten: CA, JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i></p> |
| P 43 20 623.9 | 22. Juni 1993 (22.06.93) | DE | | | | | | | | | | | |
| P 43 20 624.7 | 22. Juni 1993 (22.06.93) | DE | | | | | | | | | | | |
| P 43 21 944.6 | 2. Juli 1993 (02.07.93) | DE | | | | | | | | | | | |
| P 44 14 787.2 | 28. April 1994 (28.04.94) | DE | | | | | | | | | | | |
| <p>(54) Title: METHOD FOR THE DIAGNOSIS AND ANALYSIS OF TUMOURS</p> <p>(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR DIAGNOSE UND ANALYSE VON TUMOREN</p> <p>(57) Abstract</p> <p>The invention concerns a method for the diagnosis and analysis of tumours, the method depending on the determination of the expression of particular variant exons of the CD44 gene. The determination can be carried out at the protein level or the nucleic-acid level. In a preferred embodiment of the invention, the expression is determined in biopsy material using exon-specific antibodies. V6 expression, for instance, is thus suitable for use as a parameter in the prognosis of mammary carcinomas, the expression of a transitional epitope coded by exon v7 and v8 together being suitable for the diagnosis of cervical carcinomas.</p> <p>(57) Zusammenfassung</p> <p>Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Diagnose und Analyse von Tumoren, das auf dem Nachweis der Expression bestimmter varianter Exons des CD44-Gens beruht. Der Nachweis kann auf Protein- oder Nukleinsäureebene erfolgen. In einer bevorzugten Ausführungsform wird die Expression in Biopsiematerial mit Hilfe exonspezifischer Antikörper nachgewiesen. So eignet sich beispielsweise die v6-Expression als prognostischer Parameter für das Mammakarzinom, die Expression eines Übergangsepitops, das von den Exons v7 und v8 gemeinsam kodiert wird, zur Diagnose des Zervixkarzinoms.</p> | | | | | | | | | | | | | |

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

| | | | | | |
|----|--------------------------------|----|-----------------------------------|----|--------------------------------|
| AT | Österreich | GA | Gabon | MR | Mauretanien |
| AU | Australien | GB | Vereinigtes Königreich | MW | Malawi |
| BB | Barbados | GE | Georgien | NE | Niger |
| BE | Belgien | GN | Guinea | NL | Niederlande |
| BF | Burkina Faso | GR | Griechenland | NO | Norwegen |
| BG | Bulgarien | HU | Ungarn | NZ | Neuseeland |
| BJ | Benin | IE | Irland | PL | Polen |
| BR | Brasilien | IT | Italien | PT | Portugal |
| BY | Belarus | JP | Japan | RO | Rumänien |
| CA | Kanada | KE | Kenya | RU | Russische Föderation |
| CF | Zentrale Afrikanische Republik | KG | Kirgisistan | SD | Sudan |
| CG | Kongo | KP | Demokratische Volksrepublik Korea | SE | Schweden |
| CH | Schweiz | KR | Republik Korea | SI | Slowenien |
| CI | Côte d'Ivoire | KZ | Kasachstan | SK | Slowakei |
| CM | Kamerun | LI | Liechtenstein | SN | Senegal |
| CN | China | LK | Sri Lanka | TD | Tschad |
| CS | Tschechoslowakei | LU | Luxemburg | TG | Togo |
| CZ | Tschechische Republik | LV | Letland | TJ | Tadschikistan |
| DE | Deutschland | MC | Monaco | TT | Trinidad und Tobago |
| DK | Dänemark | MD | Republik Moldau | UA | Ukraine |
| ES | Spanien | MG | Madagaskar | US | Vereinigte Staaten von Amerika |
| FI | Finnland | ML | Mali | UZ | Usbekistan |
| FR | Frankreich | MN | Mongolei | VN | Vietnam |

Verfahren zur Diagnose und Analyse von Tumoren

Die Erfindung betrifft Verfahren zur Diagnose und/oder Analyse von Tumoren durch Bestimmung der Expression variabler Exons des CD44-Gens, Mittel für solche Verfahren sowie deren Verwendung.

Es besteht ein Bedarf nach verbesserten Verfahren zur Diagnose und/oder Analyse von Krebserkrankungen, insbesondere auf Grundlage von molekularen Markern.

Beispielsweise findet die hämatogene Ausbreitung von Mammakarzinomen sehr früh im Krankheitsverlauf statt und steht im Zusammenhang mit dem späteren Auftreten von Fernmetastasen (Diel *et al.*, 1992). Die molekularen Mechanismen der metastatischen Ausbreitung sind immer noch unbekannt. Die prognostischen Faktoren für die Voraussage des Metastasierungsrisikos beruhen momentan hauptsächlich auf pathologischen Kriterien, wobei die Hauptfaktoren Tumorstadium, Differenzierung (Gradierung) sowie Lymphknotenmetastasierung sind (Fisher *et al.*, 1990). Allerdings treten in Einzelfällen Diskrepanzen zwischen diesen Faktoren auf, etwa indem trotz fortgeschrittener Tumorgroße oder niedriger Differenzierung (hoher Gradierung) Lymphknotenmetastasen fehlen. Wenig untersucht ist eine Untergruppe von Patientinnen mit Lymphknoten-negativem Brustkrebs, die später Fernmetastasen entwickeln. Es besteht daher ein Bedarf an Parametern, die eine bessere Voraussage der hämatogenen Tumorausbreitung sowie einer besseren Allgemeinprognose gestatten. Ein anderes Beispiel sind Magentumoren. Sie können in zwei große histologische Kategorien eingeteilt werden, den "intestinalen" und den "diffusen" Typ (Lauren, 1965). Tumoren vom intestinalen, nicht jedoch vom diffusen Typ sind oft von einer chronischen Gastritis B und insbesondere von intestinalen Metaplasien begleitet, die für Vorläufer von dysplastischen Veränderungen und von Adenokarzinomen des intestinalen Typs gehalten werden (Jida *et al.*, 1982; Jass, 1983; Kato *et al.*, 1981; Sipponen *et al.*, 1983; Sirula *et al.*, 1974; Strickland *et al.*, 1973). Pathogenetische Unterschiede zwischen diesen beiden Adenokarzinom-Typen spiegeln sich auch in der Beobachtung wider, daß Patienten mit Tumoren vom diffusen Typ oft zur Blutgruppe A gehören, was einen möglichen Einfluß von genetischen Faktoren auf das Krebsrisiko anzeigt (Piper, 1978), während Umweltfaktoren, z.B. Infektionen mit *Helicobacter pylori*, möglicherweise für die Entwicklung von Tumoren vom intestinalen Typ wichtig sind (Parsonnet *et al.*, 1991; Nomura *et al.*, 1991). Hier wäre es wünschenswert, anhand molekularer Marker zwischen Tumoren vom intestinalen und solche vom diffusen Typ unterscheiden zu können. Als drittes Beispiel sei schließlich das Zervixkarzinom des Uterus genannt. Trotz abnehmender Inzidenz (Pettersson, 1988) ist die Prognose von Patientinnen mit fortgeschrittenen Stadien von Zervixkarzinomen schlecht (Perez *et al.*, 1983; Park *et al.*, 1993; Brady *et al.*, 1986). Die Frühdiagnose

basiert auf der Auswertung früher morphologischer Veränderungen der Epithelzellen (zervikaler Abstrich). Auch hier ist es wünschenswert, definierte molekulare Marker zur frühen Krebserkennung, die für das Staging und als prognostische Faktoren verwendet werden können, zu finden.

5

Es wurde kürzlich gezeigt, daß die Expression von Varianten des Oberflächen-Glykoproteins CD44 notwendig und hinreichend ist, um sogenanntes spontanes metastatisches Verhalten sowohl in einer nicht-metastasierenden Pankreas-Adenokarzinom-Zelllinie der Ratte als auch in einer nicht-metastasierenden Fibrosarkom-Zelllinie der Ratte auszulösen (Günthert *et al.*, 1991). Während die kleinste CD44-Isoform, die Standardform CD44s, in einer Reihe verschiedener Gewebe, darunter Epithelzellen, ubiquitär exprimiert wird, werden bestimmte Spleißvarianten von CD44 (CD44v) nur auf einer Untergruppe von Epithelzellen exprimiert. Die CD44-Isoformen werden durch alternatives Spleißen so erzeugt, daß die Sequenzen von 10 Exons (v1-v10) in CD44s komplett ausgeschnitten werden, jedoch bei den größeren Varianten in verschiedenen Kombinationen vorkommen können (Screaton *et al.*, 1992; Heider *et al.*, 1993; Hofmann *et al.*, 1991). Die Varianten unterscheiden sich dadurch, daß an einer bestimmten Stelle des extrazellulären Teils des Proteins unterschiedliche Aminosäuresequenzen inseriert sind. Solche Varianten konnten in verschiedenen menschlichen Tumorzellen und in menschlichem Tumorgewebe nachgewiesen werden. So wurde kürzlich die Expression von CD44-Varianten im Verlauf der kolorektalen Karzinogenese untersucht (Heider *et al.*, 1993). Die Expression von CD44-Varianten fehlt in normalem menschlichem Kolonepithel, und nur eine schwache Expression ist in den proliferierenden Zellen der Krypten nachweisbar. In späteren Stadien der Tumorprogression, z.B. in Adenokarzinomen, exprimieren alle malignen Entartungen Varianten von CD44. Weiter wurde kürzlich Expression von CD44-Spleißvarianten in aktivierten Lymphozyten sowie in Non-Hodgkin-Lymphomen gezeigt (Koopman *et al.*, 1993).

10

15

20

25

30

Aufgabe der vorliegenden Erfindung war die Entwicklung von neuen Verfahren zur Diagnose und Analyse von Tumoren sowie die Bereitstellung von Mitteln für solche Verfahren.

35

Diese Aufgabe konnte mit der vorliegenden Erfindung gelöst werden. Sie betrifft ein Verfahren zur Diagnose und/oder Analyse von Tumoren, insbesondere Karzinomen, das dadurch gekennzeichnet ist, daß variantes CD44 als molekularer Marker verwendet wird.

Bevorzugt werden dabei Verfahren, die auf dem Nachweis der Expression einzelner, definierter variabler Exons des CD44-Gens oder definierter Kombinationen solcher Exons

beruhen. Dabei kann es vorteilhaft sein, die Expression verschiedener varianter Exons in einer Probe zu untersuchen und zueinander ins Verhältnis zu setzen.

Besonders bevorzugt sind Verfahren, die auf dem Nachweis der Expression der variablen Exons v5, v6 und/oder dem Nachweis der kombinierten Expression der Exons v7 und v8 beruhen.

Die erfindungsgemäßen Verfahren können an Proben außerhalb des menschlichen oder tierischen Körpers oder aber *in vivo* vorgenommen werden.

10

Vorteilhaft können mit den erfindungsgemäßen Verfahren Proben von Patienten untersucht werden, bei denen der Verdacht auf Mamma-, Magen-, Kolon- oder Zervixkarzinom besteht oder die Diagnose bereits vorliegt, der Tumor aber genauer charakterisiert werden soll. Insbesondere kann bei Verdacht auf/Diagnose von Kolonkarzinom die Expression des varianten Exons v6, bei Verdacht auf/Diagnose von Mamma- bzw. Magenkarzinom die Expression der Exons v5 und/oder v6 und bei Verdacht auf/Diagnose von Zervixkarzinom die kombinierte Expression der variablen Exons v7 und v8 untersucht werden.

Der Nachweis varianter CD44-Moleküle kann auf Proteinebene mittels Antikörpern oder auf Nukleinsäureebene mittels spezifischer Nukleinsäuresonden oder Primern für die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) erfolgen. Die Erfindung betrifft demzufolge auch Antikörper und Nukleinsäuren, die als Sonden bzw. Primer für solche Verfahren geeignet sind, und die Verwendung solcher Antikörper und Nukleinsäuren zur Diagnose und Analyse von Tumoren, insbesondere Karzinomen.

25

Entsprechend betrifft die Erfindung bevorzugt auch Antikörper gegen Epitope, die von Exons v5, v6, v7 und/oder v8 kodiert werden, sowie Nukleinsäuren, die mit den Exons v5, v6, v7 und/oder v8 hybridisieren können, ferner Primer, die zur RT-PCR-Amplifikation von RNA, die die Exons v5, v6, v7 und/oder v8 enthält, verwendet werden können. Soll die kombinierte Expression der varianten Exons v7 und v8 untersucht werden, kann dies vorzugsweise mit einem Antikörper geschehen, der gegen ein Epitop gerichtet ist, daß von diesen Exons gemeinsam kodiert wird (Übergangsepitop).

Zur *in-vivo*-Diagnostik können die CD44v-spezifischen Antikörper beispielsweise mit einem detektierbaren Marker, z. B. einem Radioisotop, verknüpft und in das Gefäßsystem eines Patienten injiziert werden. Nach der selektiven Bindung der Antikörper an den Tumor kann dieser mit einem geeigneten Detektionssystem visualisiert werden. Protokolle

35

für solche immundiagnostischen Verfahren *in vivo* sind Stand der Technik (Thomas *et al.*, 1989).

Die Nuklein- und Aminosäuresequenz der varianten Exons des CD44-Gens ist bekannt (Hofmann *et al.*, 1991, Screaton *et al.*, 1992, Tölg *et al.*, 1993). Die Existenz degenerierter oder alleler Varianten ist für die Ausführung der Erfindung nicht von Bedeutung; solche Varianten sind daher ausdrücklich mit eingeschlossen.

Die Sequenz von Exon v5 des menschlichen CD44-Gens ist (SEQ ID NO: 1):

10

(D) V D R N G T T A Y E G N W
(CAG) AT GTA GAC AGA AAT GGC ACC ACT GCT TAT GAA GGA AAC TGG

15

N P E A H P P L I H H E H H E
AAC CCA GAA GCA CAC CCT CCC CTC ATT CAC CAT GAG CAT CAT GAG
E E E T P H S T S T
GAA GAA GAG ACC CCA CAT TCT ACA AGC ACA A.

20

Die Sequenz von Exon v6 des menschlichen CD44-Gens ist (SEQ ID NO: 3):

25

Q A T P S S T T E E T A T Q
TC CAG GCA ACT CCT AGT AGT ACA ACG GAA GAA ACA GCT ACC CAG

30

K E Q W F G N R W H E G Y R Q
AAG GAA CAG TGG TTT GGC AAC AGA TGG CAT GAG GGA TAT CGC CAA

35

T P R E D S H S T T G T A
ACA CCC AGA GAA GAC TCC CAT TCG ACA ACA GGG ACA GCT G.

Die Sequenz von Exon v7 des menschlichen CD44-Gens ist (SEQ ID NO: 5):

35

A S A H T S H P M Q G R T T
CA GCC TCA GCT CAT ACC AGC CAT CCA ATG CAA GGA AGG ACA ACA

P S P E D S S W T D F F N P
CCA AGC CCA GAG GAC AGT TCC TGG ACT GAT TTC TTC AAC CCA

I S H P M G R G H Q A G R R
5 ATC TCA CAC CCC ATG GGA CGA GGT CAT CAA GCA GGA AGA AGG

M D
ATG G.

10

Die Sequenz von Exon v8 des menschlichen CD44-Gens ist (SEQ ID NO: 7):

M D S S H S T T L Q P T A N
AT ATG GAC TCC AGT CAT AGT ACA ACG CTT CAG CCT ACT GCA AAT

15

P N T G L V E D L D R T G P
CCA AAC ACA GGT TTG GTG GAA GAT TTG GAC AGG ACA GGA CCT

20

L S M T T Q
CTT TCA ATG ACA ACG C.

Die erfindungsgemäßen Antikörper sind demzufolge vorzugsweise gegen Epitope innerhalb der dargestellten Aminosäuresequenzen oder deren allele Varianten gerichtet. Ein Antikörper gegen das Übergangsepitop v7/v8 erkennt besonders bevorzugt ein Epitop innerhalb der Aminosäuresequenz (SEQ ID NO: 9)

25

ASAHTSHPMQGRITTPSPEDSSWTDFNPI SHPMGRGHQAGRRMDMDSSHSTTLQOPTANPNT
GLVEDLDRTGPLSMTTQ

30 oder einer allelen Variante dieser Sequenz.

Ebenfalls besonders bevorzugt ist ein v6-spezifischer Antikörper, der an ein Epitop innerhalb der Aminosäuresequenz (SEQ ID NO: 10)

35 QWFGNRWHEGYRQT

oder einer allelen Variante dieser Sequenz bindet.

Besonders bevorzugt sind monoklonale Antikörper. Für das erfindungsgemäße Verfahren können jedoch auch andere Antikörpermoleküle verwendet werden, z.B. Fab- oder F(ab')₂-Fragmente von Immunglobulinen, rekombinant hergestellte single-chain-Antikörper (scFv), chimäre bzw. humanisierte Antikörper sowie andere Moleküle, die spezifisch an Epitope binden, die durch Exons v5, v6, v7 und/oder v8 kodiert werden. Die Herstellung von Antikörpern gegen bekannte Aminosäuresequenzen kann nach an sich bekannten Methoden erfolgen (Catty, 1989). Beispielsweise kann ein Peptid dieser Sequenz synthetisch hergestellt und als Antigen in einem Immunisierungsprotokoll eingesetzt werden. Ein anderer Weg ist die Herstellung eines Fusionsproteins, das die gewünschte Aminosäuresequenz enthält, indem eine Nukleinsäure (die synthetisch oder z.B. durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR) aus einer geeigneten Probe hergestellt werden kann), die für diese Sequenz kodiert, in einen Expressionsvektor integriert und das Fusionsprotein in einem Wirtsorganismus exprimiert wird. Das gegebenenfalls gereinigte Fusionsprotein kann dann als Antigen in einem Immunisierungsprotokoll eingesetzt und Insert-spezifische Antikörper oder, im Falle monoklonaler Antikörper, Hybridome, die insertspezifische Antikörper exprimieren, mit geeigneten Verfahren selektiert werden. Solche Verfahren sind Stand der Technik. Heider *et al.* (1993) und Koopman *et al.* (1993) beschreiben die Herstellung von Antikörpern gegen variante Epitope von CD44.

Ebenfalls als Mittel zur Ausführung können Nukleinsäuren dienen, die mit varianten Exons, insbesondere v5, v6, v7 und/oder v8, hybridisieren, insbesondere solche mit einer Homologie von mehr als 80 % zu den entsprechenden Exonsequenzen. Die Herstellung solcher Nukleinsäuren kann nach an sich bekannten Methoden erfolgen. Dies gilt analog auch für Primer, die in der RT-PCR von RNA zum Nachweis der Expression der Exons v5, v6, v7 und/oder v8 verwendet werden können.

Die Ausführung des erfindungsgemäßen Verfahrens zur Diagnose und/oder Analyse von Tumoren, insbesondere von Karzinomen, kann zweckmäßig durch Untersuchungen von aus dem Körper entnommenen Proben, beispielsweise aus Biopsien, erfolgen. Vorteilhaft können dabei die erfindungsgemäßen Mittel verwendet werden.

Beispielsweise können Gewebsschnitte immunhistochemisch mit den erfindungsgemäßen Antikörpern mit an sich bekannten Methoden untersucht werden. Aus Gewebeproben gewonnene Extrakte oder Körperflüssigkeiten können ferner mit anderen immunologischen Methoden unter Verwendung der besagten Antikörper untersucht werden, beispielsweise in Western Blots, Enzyme-linked Immunosorbent Assays (ELISA, Catty *et al.* Raykundalia, 1989), Radioimmunoassays (RIA, Catty *et al.* Murphy, 1989) oder verwandten Immunoassays.

Der Nachweis der Expression varianter Exons kann auch auf Nukleinsäureebene erfolgen, beispielsweise durch Hybridisierung von aus Gewebeproben gewonnener RNA (Northern Blot) oder RT-PCR-amplifizierter RNA mit geeigneten Primern, oder durch Hybridisierung von Nukleinsäuren in Gewebsschnitten mit geeigneten Proben (*in-situ*-Hybridisierung).

Die Untersuchungen können qualitativ, semiquantitativ oder quantitativ erfolgen.

Durch Nachweis und/oder Quantifizierung der Expression varianter CD44-Epitope erhobene Daten können so in die Diagnose und Prognose einfließen. Vorteilhaft kann dabei die Kombination mit anderen prognostischen Parametern sein, etwa mit der Gradierung.

Die erfindungsgemäßen Verfahren und Mittel eignen sich hervorragend zur Diagnose und/oder Analyse von Tumoren, insbesondere von Karzinomen. Dies belegen die nachstehenden Beispiele. So sind die v5- und v6-Expression gute prognostische Parameter für das Mammakarzinom. Die vergleichende Untersuchung der v5- und der v6-Expression erlaubt einen wesentlichen Beitrag zur Differentialdiagnose von intestinalem und diffusem Magenkarzinom. Beim Kolonkarzinom korreliert die v6-Expression sehr gut mit dem Tumorstadium. Der Nachweis der Expression des durch v7/v8 kodierten Übergangsepitops ist ein bedeutender diagnostischer Parameter bei der Diagnose des Zervixkarzinoms.

Abbildungen

Fig. 1: Schematische Darstellung eines CD44-Moleküls, das die varianten Exons v2 bis v10 enthält. Schraffierte Kästen symbolisieren CD44-Standardsequenzen (CD44s). TM = Transmembrandomäne. Die ungefähre Lokalisierung der Epitope, die von verschiedenen monoklonalen (schwarze Balken) und polyklonalen (graue Balken) Antikörpern erkannt werden, ist angezeigt. Die Antikörper VFF7, VFF8 und VFF16 sind jeweils für ein Exon spezifisch, wohingegen mAb VFF17 mit einem Epitop reagiert, daß von den Exons v7 und v8 gemeinsam kodiert wird.

10

Fig. 2: Aktuarielle Überlebenskurve für Mammakarzinompatientinnen zum Zusammenhang von Lymphknotenbeteiligung und Überlebenszeit, berechnet auf Grundlage der Kaplan-Meier-Kalkulation und logarithmischem Reihentest.

15

Fig. 3: Aktuarielle Überlebenskurve für Mammakarzinompatientinnen zum Zusammenhang von Tumorgradierung und Überlebenszeit, berechnet auf Grundlage der Kaplan-Meier-Kalkulation und logarithmischem Reihentest.

20

Fig. 4: Aktuarielle Überlebenskurve für Mammakarzinompatientinnen zum Zusammenhang von Exon-v3-Expression und Überlebenszeit, berechnet auf Grundlage der Kaplan-Meier-Kalkulation und logarithmischem Reihentest. Patienten mit primärem invasivem Mammakarzinom, das CD44-v3-Epitop exprimiert, versus Nicht-Exprimierer. 6/28 Patienten mit v3-negativem Primärtumor und 12/31 mit v3-positivem Tumor starben im Beobachtungszeitraum von 70 Monaten.

25

Fig. 5: Aktuarielle Überlebenskurve für Mammakarzinompatientinnen zum Zusammenhang von Exon-v6-Expression und Überlebenszeit, berechnet auf Grundlage der Kaplan-Meier-Kalkulation und logarithmischem Reihentest. Patienten mit primärem invasivem Mammakarzinom, das CD44-v6-Epitop exprimiert, versus Nicht-Exprimierer. 1/14 Patienten mit v6-negativem Primärtumor und 17/45 mit v6-positivem Tumor starben im Beobachtungszeitraum von 70 Monaten.

30

Fig. 6: Aktuarielle Überlebenskurve für Mammakarzinompatientinnen zum Zusammenhang von v3-Expression, kombiniert mit Gradierung, und Überlebenszeit, berechnet auf Grundlage der Kaplan-Meier-Kalkulation und logarithmischem Reihentest.

35

Fig. 7: Aktuarielle Überlebenskurve für Mammakarzinompatientinnen zum Zusammenhang von v6-Expression, kombiniert mit Gradierung, und Überlebenszeit, berechnet auf Grundlage der Kaplan-Meier-Kalkulation und logarithmischem Reihentest.

Fig. 8: CD44v-Expression im menschlichen Mammakarzinom. Immunhistochemie eines duktal-invasiven Mammakarzinoms mit anti-CD44v-Antiserum. (A): Primärtumor. (B): Lymphknotenmetastasen. Gegenfärbung: Hämatoxylin. Originalvergrößerung: 20 x.

Fig. 9: Immunhistochemie von normaler Mucosa sowie Adenokarzinomen des Magens. Eine fokal betonte anti-CD44v-positive Reaktion zeigt sich in Tumorzellen eines mäßig differenzierten Adenokarzinoms (intestinaler Typ nach Lauren) des Magens (a) sowie in einer regionalen Lymphknotenmetastase (b). In normaler Mucosa des Magens mit chronischer Gastritis reagieren die Foci von intestinalen Metaplasien positiv mit mAb VFF4 (c, Pfeile) sowie mit mAb VFF8 (d, Pfeile), begleitet von einer zusätzlichen Reaktion auf der mucoiden Oberfläche und dem foveolären Epithel (d, Pfeilspitzen). Fast alle Becherzellkarzinome des Magens (diffuser Typ nach Lauren) zeigen eine negative Reaktion mit mAb VFF4 (e), und im Gegensatz zu Adenokarzinomen des intestinalen Typs ist das normale mucoide Epithel negativ (e, Pfeilspitzen). In den meisten Fällen zeigt sich in diesen Becherzellkarzinomen eine positive Reaktion mit mAb VFF8 (f), und auch das verbliebene normale mucoide Epithel zeigt Immunreaktivität (f, Pfeilspitzen).

(ABC-Methode. (a), (b): anti-CD44v polyklonales Serum, 140 x; (c): VFF4, 80x; (d): VFF8, 80x; (e): VFF4, 210x; (f): VFF8, 210x; Gegenfärbung Hämatoxylin).

Fig. 10: Southern-Blot-Analyse von PCR-Amplifikationsprodukten von einzelnen Proben von normaler gastrischer Mucosa, von primären Magentumoren und entsprechenden Lymphknotenmetastasen. Die PCR-Primer waren spezifisch für CD44-Exons, die den varianten Exonsequenzen benachbart sind. cDNAs wurden durch reverse Transkription erzeugt und vor der CD44-spezifischen Amplifikation durch GAPDH-PCR kontrolliert, um Qualität und Häufigkeit der synthetisierten cDNAs zu beurteilen. Die PCR-Produkte, die mit den CD44-Standardprimern erhalten wurden, wurden durch Elektrophorese in einem 1.2%igen Agarosegel aufgetrennt und auf Hybond N⁺-Membranen (Amersham, Braunschweig, Deutschland) übertragen. Die gleichen Filter wurden nacheinander mit Exon-v5-spezifischen (Positionen 243 bis 356 der publizierten menschlichen CD44v-Sequenz nach Hofmann *et al.*, 1991) (A) und Exon-v6-spezifischen (Positionen 360 bis 482) (B) Proben hybridisiert. Spuren 1 bis 5: 5 verschiedene primäre Adenokarzinome des Magens (PT) mit entsprechenden Lymphknotenmetastasen (LN), die in der Probensammlung, die immunhistochemisch untersucht wurde, nicht enthalten waren; Spuren 1 bis 4: intestinaler Typ; Spur 5:

diffuser Typ, *Spuren 6 bis 9*: Normale gastrische Mucosa von vier verschiedenen Patienten aus der Korpus-(*Spuren 6-8*) und Antrumregion (*Spur 9*).

Fig. 11: Reverse Transkription/PCR-Amplifikation von CD44-Transkripten in Magenkarzinom-Zelllinien. Oberer Teil: PCR-Amplifikationsprodukte nach Benutzung von CD44-Standardprimern. Die Erststrangsynthese wurde mit polyadenylierter RNA aus den Magenkarzinomzelllinien 2474, 2957 und 3051 durchgeführt. Unterer Teil: GADPH-spezifische PCR-Amplifikationsprodukte der gleichen RNA-Proben. Die Proben wurden in einem 1.2%igen Agarosegel aufgetrennt, mit Ethidiumbromid gefärbt und unter UV-Licht sichtbar gemacht.

Fig. 12: Southern-Blot-Analyse von CD44-PCR-Amplifikationsprodukten in Magenkarzinom-Zelllinien. Die PCR-Reaktionen von *Fig. 11* wurden in einem 1.2%igen Agarosegel aufgetrennt, auf eine Hybond N⁺-Membran übertragen und nacheinander mit Proben hybridisiert, die für verschiedene variante CD44-Exons spezifisch waren. v3-10 enthält Nukleotide von Position 25 bis 1013; v5/v6 enthält Nukleotide von Position 244 bis 468; v8-10 enthält Nukleotide von Position 623 bis 981 der veröffentlichten menschlichen varianten CD44-Exonsequenzen (Hofmann *et al.*, 1991).

Fig. 13: Expression varianter CD44-Exons in verschiedenen Stadien der kolorektalen Tumorprogression. Ergebnisse aus immunhistochemischen Anfärbungen von Gewebsschnitten.

Fig. 14: Immunhistochemie von normalem Zervixepithel (*A, C, E, G*) und einem Plattenepithel-Karzinom der Zervix. (*B, D, F, H*). Alle normalen Zervixgewebeproben zeigen eine starke Färbungsreaktion mit den polyklonalen Seren *anti-CD44v3-v10* (*A*) *anti-v3-v4* (*C*), *anti-v6-v7*, VFF7, VFF8 und VFF16 (nicht gezeigt). Die Färbungsreaktionen waren beschränkt auf das *stratum basale* und das *stratum spinosum*, während das *stratum superficiale* ungefärbt blieb. Der mAb VFF17 zeigte überhaupt keine Färbung von normalen Epithelzellen (*E*). Der mAb SFF2, der gegen CD44s gerichtet ist, färbte alle Zellschichten stark (*G*). Die meisten der Zervixkarzinom-Proben zeigten starke Färbungsreaktionen mit allen polyklonalen Seren und mAbs einschließlich mAb VFF17. Repräsentative Beispiele sind in den Figuren (*B*) (*anti-CD44v3-v10*), (*D*) (mAb VFF7), (*F*) (VFF17), und (*H*) (mAb SFF2) gezeigt. Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex-Methode. Vergrößerung: x 140 (*A-D, F-H*), x 80 (*E*); Gegenfärbung: Hämatoxylin.

Fig. 15: Southern-Blot-Analyse von PCR-Amplifikationsprodukten von individuellen Proben von normalen Geweben des Zervix uteri. Die PCR-Primer waren spezifisch für

Beispiele

Beispiel 1: Diagnose und Analyse von Mammakarzinomen

1.1. Tumoren und Gewebe

Gefrorene Gewebe (aufbewahrt bei -70°C) wurden von der Universitätsfrauenklinik Heidelberg, Deutschland, erhalten. Sie wurden für die Immunhistologie eingesetzt, wobei die unten beschriebenen Antikörper verwendet wurden. Eingeschlossen waren 61 Proben von primären Mammakarzinomen, 9 lokale Rezidive von Mammakarzinomen, 4 Fälle von reinen *in-situ*-Karzinomen und 16 axilläre Lymphknotenmetastasen (von den gleichen Patienten wie die Primärtumoren). Die Fälle wurden zufällig ausgewählt und schlossen eine repräsentative Auswahl von histologischen Tumortypen, Stadien und Gradierungen ein. Zum Vergleich wurden Proben von normalem Brustgewebe, duktalem Hyperplasien und Fibroadenomen ausgewählt.

1.2. Herstellung von Antikörpern gegen Epitope, die von varianten Exonsequenzen des CD44-Gens kodiert werden

1.2.1. Klonierung von pGEX-Fusionsproteinen

Die gesamte variante Region des HPKII-Typs von CD44v (Hofmann *et al.*, 1991) wurde aus menschlicher Keratinozyten-cDNA durch Polymerase-Kettenreaktion (PCR) amplifiziert. Die beiden PCR-Primer 5'-CAGGCTGGGAGCCAAATGAAGAAAATG-3' (SEQ ID NO: 11), Positionen 25-52, und 5'-TGATAAGGAACGATTGACATTAGAGTTGGA-3' (SEQ ID NO: 12), Positionen 1013-984 der LCLC97-varianten Region, wie von Hofmann *et al.* beschrieben, enthielten eine *EcoRI*-Erkennungsstelle, die benutzt wurde, um das PCR-Produkt direkt in den Vektor pGEX-2T (Smith *et al.*, 1988) zu klonieren. Das resultierende Konstrukt (pGEX CD44v HPKII, v3-v10) kodiert für ein Fusionsprotein von ~70 kD, bestehend aus Glutathion-S-transferase von *Schistosoma japonicum* und den Exons v3-v10 von humanem CD44 (Fig. 1; Heider *et al.*, 1993). Das Fusionsprotein wurde in *E. coli* exprimiert und anschließend über Glutathion-Agarose affinitätsgereinigt (Smith *et al.*, 1988).

Um Subklone der varianten Regionen zu erhalten, die für Affinitätsreinigungen und Western-Blot-Analysen verwendet werden konnten, wurden Fragmente kloniert, die DI

CD44-Exons in der Nachbarschaft der varianten Exonsequenzen. cDNAs wurden durch reverse Transkription hergestellt und vor der CD44s-Amplifikation mit Glycerinaldehyd-Phosphat-Dehydrogenase-PCR getestet, um die Qualität und Menge der synthetisierten cDNAs zu überprüfen (*K*). Die PCR-Produkte, die mit CD44-Standard-Primern erhalten wurden, wurden auf 1.2%iger Agarose (*I*) aufgetrennt und auf eine Hybond-N+-Membran (Amersham) transferiert. Der gleiche Filter wurde dann nacheinander mit Proben hybridisiert, die für die varianten Exons v3-v10 (A-H) spezifisch waren, wie in der Figur angezeigt. Spuren 1-4: normale Zervixproben von 4 verschiedenen Patienten. Expositionszeit: 45-60 Minuten.

10

Fig. 16: Southern-Blot-Analyse von PCR-Amplifikationsprodukten von individuellen Proben von Tumoren des *Zervix uteri*. Die PCR-Primer waren die gleichen wie in Fig. 15 beschrieben. Die PCR Produkte, die mit CD44-Standard-Primern erhalten wurden, wurden auf einem Agarosegel aufgetrennt (*I*). Nach dem Southern Blotting wurde der Filter nacheinander mit Proben hybridisiert, die spezifisch für die varianten Exons v3-v10 (A-H) waren, wie in der Figur angezeigt *Spur 1:* negative Kontrolle; *Spur 2:* Brusttumorprobe als positive Kontrolle; *Spuren 3-14:* Zervixtumor-Proben von 12 verschiedenen Patientinnen. Spur 7 stellt den gleichen Tumor dar wie in Fig. 14 gezeigt. Expositionszeit: 2-5 Minuten (A-H), 15-20 Minuten (L).

20

Im folgenden wird die Eignung des erfindungsgemäßen Verfahrens zur Diagnose und/oder Analyse von Tumoren beispielhaft für Mamma-, Magen-, Kolon- und Zervixkarzinome demonstriert.

25

(v3), DII/III (v5, v6), und DIII (v6, v7) enthielten, wobei die passenden Restriktionsschnittstellen verwendet wurden. Fusionsprotein DI enthält die CD44-Sequenz, die von Stamenkovic *et al.* (1989) beschrieben wurde, von Position 744, bis zur Position 142 der Sequenz von variantem CD44, wie sie von Hofmann *et al.* (1991) beschrieben wurde. Fusionsprotein
5 DII/III enthält die variante Sequenz von Position 290-460, Fusionsprotein DIII die variante Sequenz von Position 378-638 (Hofmann *et al.*, 1991). Die DI und DIII enthaltenden Fragmente wurden in das pGEX-Vektorsystem, das DII/III-Fragment in den pATH-Vektor (Angel *et al.*, 1988) kloniert.

10

1.2.2. Monoklonale Antikörper: Immunisierung und Screening

Weibliche Balb/c Mäuse wurden intraperitoneal mit affinitätsgereinigtem Fusionsprotein (GST-CD44v3-10) immunisiert. Bei der 1. Immunisierung wurden 90 µg Fusionsprotein in komplettem Freund'schen Adjuvans, bei der 2. und 3. Immunisierung je 50 µg
15 Fusionsprotein in inkomplettem Freund'schen Adjuvans appliziert. Die Immunisierungen erfolgten im Abstand von jeweils 4 Wochen. 14 Tage nach der letzten Immunisierung wurden die Tiere noch an drei aufeinanderfolgenden Tagen mit jeweils 10 µg Fusionsprotein in PBS immunisiert. Am darauffolgenden Tag wurden Milzzellen eines Tieres mit hohem
20 Antikörpertiter mit P3.X63-Ag8.653-Mausmyelomzellen mit Hilfe von Polyethylenglycol 4000 fusioniert. Die Hybridomzellen wurden dann in Mikrotiterplatten in HAT-Medium selektioniert (Köhler *et al.* Milstein, 1975; Kearney *et al.*, 1979).

Die Bestimmung des Antikörpertiters im Serum bzw. das Screening der Hybridomüberstände wurde mit Hilfe eines ELISAs durchgeführt. Bei diesem Test werden zunächst
25 Mikrotiterplatten mit Fusionsprotein (GST-CD44v3-10) oder nur mit Glutathion-S-transferase beschichtet. Anschließend wurde mit seriellen Verdünnungen von Serumproben bzw. Hybridomüberständen inkubiert und die spezifischen Antikörper mit Peroxidase-konjugierten Antikörpern gegen Maus-Immunglobulin nachgewiesen. Hybridome, die nur mit
30 Glutathion-S-transferase reagierten, wurden verworfen. Die verbleibenden Antikörper wurden zunächst in einem ELISA mit domänenspezifischen Fusionsproteinen (Exon v3, Exon v5 + v6, Exon v6 + v7, Exon v8 - v10) charakterisiert (Koopman *et al.*, 1993). Ihre immunhistochemische Reaktivität wurde an menschlichen Hautschnitten getestet.

35 Die Exonspezifität verschiedener Antikörper ist in Fig.1 dargestellt. VFF7 erkennt ein Epitop in der Aminosäuresequenz von Exon v6. VFF8 erkennt ein Epitop in der Aminosäuresequenz von Exon v5. VFF-17 erkennt ein Epitop, das von den Exons v7 und v8 ge-

meinsam kodiert wird. Die Antikörper NKI-P1 und SFF2 erkennen Epitope im Standardanteil der extrazellulären Domäne in der Nähe des N-Terminus.

5 1.2.3. Polyklonale Antikörper

Die Herstellung und Reinigung polyklonaler Antiseren gegen die variante Region des CD44-Moleküls ist in der Literatur beschrieben (Heider *et al.*, 1993). Die Exonspezifität des Gesamtserums (anti-CD44v) sowie affinitätsgereinigter Fraktionen (anti-DI, anti-DIII) ist in Fig. 1 angezeigt.

1.3. Immunhistochemie von Gewebsschnitten von Mammakarzinomen und Auswertung im Vergleich mit anderen prognostischen Faktoren

15

Immunfärbungen wurden nach Standardprotokollen wie früher beschrieben durchgeführt (Heider *et al.*, 1993). Gefrierschnitte (6-7 µm) wurden in eisgekühltem Methanol 4 min., dann in Aceton 1 min. fixiert, in PBS (8 g/l NaCl, 0.2 g/l KCl, 1.44 g/l Na₂HPO₄, 0.24 g/l KH₂PO₄, pH 7.4) gewaschen und mit normalem Ziegenerum (10% in PBS) präinkubiert. Dann wurden sie 3x mit PBS gewaschen und für 1 Stunde mit dem Primärantikörper (in PBS, 1% BSA) inkubiert. Für monoklonale Antikörper wurde eine Endkonzentration von 5 µg/ml verwendet. Affinitätsgereinigte polyklonale Seren wurden auf normalen Hautkeratinozyten titriert, um optimale Färbungsergebnisse zu erhalten. Endogene Peroxidase wurde mit 0.3 % H₂O₂ in Methanol blockiert und die Schnitte mit biotinyliertem Zweitantikörper (entweder anti-Maus oder anti-Kaninchen F(ab')₂, DAKO Corp., Santa Barbara, CA, USA, abhängig vom verwendeten Primärantikörper) inkubiert. Der Immunkomplex wurde mit Meerrettich-Peroxidase visualisiert, die als Streptavidin-Biotin-Peroxidasekomplex an Biotin gekoppelt wurde (DAKO). Nach dreißigminütiger Inkubation mit dem Streptavidin-Biotin-Peroxidase-Komplex wurden die Schnitte mit 3,3-Amino-9-ethyl-carbazol (Sigma Chemicals, Deisenhofen, Deutschland) für 5 bis 10 min. entwickelt und die Reaktion mit H₂O abgestoppt. Die Zellen wurden mit Hämatoxylin gegengefärbt, mit Glycerin-Gelatine eingedeckelt und mikroskopisch untersucht.

Eine Auswertung der Expression von Spleißvarianten wurde bei einer Gesamtzahl von 60 primären Brusttumoren durchgeführt. Bei 59 Patienten wurden in einem ausreichend langen Zeitraum Nachfolgeuntersuchungen durchgeführt (Mittel 35 Monate, Bereich 3-77), um eine Auswertung des prognostischen Einflusses zu erlauben. Das mittlere Alter der

Patienten betrug 51 (31-79) Jahre. 21 Frauen hatten keine axillären Lymphknotenmetastasen. Zwischen einem und neun positive Knoten wurden in 21 Patienten gefunden, 10 oder mehr traten bei 16 Patienten auf. 11 Patienten erhielten nach der primären chirurgischen Therapie keine weitere adjuvante Therapie, während 12 Patienten mit 30 mg Tamoxifen für 2 Jahre behandelt wurden und 36 Patienten je sechs Zyklen zytotoxische Chemotherapie erhielten. Die Gefrierschnitte wurden kodiert und in verschiedenen Laboratorien unabhängig voneinander im Hinblick auf nukleäre und histologische Gradierung sowie auf immunhistologische Färbung mit Antikörpern gegen das v6-Epitop ausgewertet. Die Auswertung der gefärbten Objektträger wurde ohne Kenntnis des Krankheitsverlaufs durchgeführt. Parallel dazu wurden andere CD44-Epitope untersucht. Die Färbung wurde auf einer Skala von 0-4 gewichtet. Eine Färbung von 0-1 wurde als negativ (14 Patienten), eine Färbung von 2-4 positiv (45 Patienten) bewertet.

Die untersuchten Tumorproben waren fast 100 % positiv für eine der CD44-Isoformen, während normales Mammaepithel sowie benigne Hypertrophien CD44 nicht exprimierten. 82 % dieser Tumoren trugen das v6-Epitop. Ein typisches Färbungsmuster eines Tumorschnittes zeigt Fig. 8. Alle Lymphknotenmetastasen (16 Fälle) waren v6-positiv, was nahelegt, daß v6-Expression mit fortgeschrittenem Tumorstadium korreliert.

Die semiquantitative Auswertung der immunologischen Reaktionen ergab überraschend einen engen Zusammenhang zwischen v6-Expression und Prognose. Die Expression anderer untersuchter Epitope, z.B. v3 oder v10, ergab keine so enge Korrelation. Die univariate Überlebensanalyse (Tabelle 1) zeigte, daß hohe Expression des varianten Epitops v6 (Antikörper VFF7) ein signifikanter prognostischer Parameter für eine schlechte Gesamtüberlebenszeit (OAS, $p = 0.02$, Tabelle 1 und Fig. 5) ist. Der prognostische Wert ist besser als der des Lymphknotenstatus ($p = 0.05$) und der der S-Phasen-Fraktion ($p = 0.03$) und vergleichbar mit dem der histologischen Gradierung. Zusätzlich wurde der Zusammenhang zwischen Lymphknotenbeteiligung bzw. v6-Expression und OAS mit einer multivariaten Cox-Regressionsanalyse untersucht (Tabelle 2). Das Risikoverhältnis war in Patienten mit einer kleinen Zahl von Lymphknotenmetastasen geringer im Vergleich zu solchen mit vielen positiven Knoten. Die Expression des v6-Epitops korrelierte ebenfalls mit einem erhöhten Risikoverhältnis. Die Bestimmung des v6-Epitops ist bei der Voraussage der OAS dem Lymphknotenstatus überlegen. Analoges gilt für die v5-Expression. Die univariate Überlebensanalyse zeigte, daß hohe Expression des Epitops v5 (Antikörper VFF8) ebenfalls ein signifikanter prognostischer Parameter für eine schlechte Gesamtüberlebenszeit ist ($p = 0.02$). Das v3-Epitop zeigt ebenfalls einen Zusammenhang mit einer schlechten OAS, jedoch lediglich im Grenzbereich der Signifikanz ($p = 0.08$, Tabelle 1 und Fig. 4). Dagegen ist v10-Expression ein deutlich schlechterer prognostischer Parameter ($p = 0.3$). Die Unterschiede

zwischen den Expressionsraten der varianten Exons läßt sich mit dem Vorliegen von gemischten Populationen erklären, in der unterschiedliche Spleißvarianten nebeneinander existieren. Obwohl die Präsenz von v3- und v6-Sequenzen korreliert ist ($p = 0.001$), ist v6 die bessere Determinante der Tumorprogression. Hohe v6-Expression korreliert signifikant mit positivem Lymphknotenstatus ($p = 0.05$) und hohem S-Phasenanteil ($p = 0.008$) sowie histologischer Gradierung ($p = 0.06$). Die Kombination von v6-Oberflächenexpression und histologischer Gradierung verbessert die prognostische Signifikanz. Alle Patienten, deren Primärtumoren einen niedrigen v6-Gehalt hatten und die gut differenziert waren, überlebten die Krankheit (Fig. 7). Mehr als 50 % der Patienten, die v6-positive Primärtumorzellen des Grades 3 hatten, starben innerhalb von 65 Monaten. War jeweils einer der beiden Faktoren ungünstig, war die Überlebensrate intermediär ($p = 0.004$). Die Kombination von v3-Epitop und histologischer Gradierung war nicht besser als die Gradierung allein ($p = 0.02$). Adjuvante zytotoxische Therapie war effektiver, wenn der Tumor Exon v6 nicht exprimierte ($p = 0.07$), als wenn er es tat.

Die Untersuchung demonstriert klar den überraschenden prognostischen Wert des erfindungsgemäßen Verfahrens, insbesondere auf Grundlage der Expression der varianten Exons v5 und v6, für das Mammakarzinom.

Tabelle 1: Univariate Analyse zum Vergleich von Gesamtüberlebenszeit (OAS) in Relation zu üblichen prognostischen Faktoren und der Expression der Spleißvarianten v3 und v6 in 59 Brustkrebs-Patienten unter Verwendung von Petos logarithmischem Reihentest

| Parameter | OAS p-Wert |
|---|---------------|
| Patientenalter bei Diagnose (< 50 / ≥ 50 Jahre) | 0.5 |
| Größe des Primärtumors (< 2 / < 5 / ≥ 5 cm) | 0.6 |
| Gradierung (I / II / III) | 0.02 |
| beteiligte axilläre Lymphknoten (0-3 / ≥ 4) | 0.05 |
| beteiligte Lymphgefäße benachbart zum Tumor (negativ / positiv) | 0.03 |
| Östrogenrezeptor (< 20 / ≥ 20 fmol/mg) | 0.001 |
| Progesteronrezeptor (< 20 / ≥ 20 fmol/mg) | 0.001 |
| Ploidität, DNA-Index (< 1.1 / ≥ 1.1.) | 0.8 |
| Prozentzahl der Zellen in der S-Phasen-Fraktion (< 5 / ≥ 5 %) | 0.1 |
| Exon v3 (DI) (Wertung 0-1 / 2-4) | 0.08 |
| Exon v5 (VFF8) (Wertung 0-1 / 2-4) | 0.02 |
| Exon v6 (VFF7) (Wertung 0-1 / 2-4) | 0.02 |
| Exon v10 (VFF16) (Wertung 0-1 / 2-4) | 0.3 |
| Exon v3 + Gradierung (0 / 1 / 2 ungünstige Parameter) | 0.02 |
| Exon v6 + Gradierung (0 / 1 / 2 ungünstige Parameter) | 0.004 |

Tabelle 2: Multivariate Analyse, die das Ergebnis einer proportionalen Risiko-Regressionsanalyse des gleichzeitigen Einflusses des nodalen Status und der Oberflächenexpression des CD44-v6-Epitops auf die OAS zeigt. Es wurde Cox's partielles nichtparametrisches Regressionsmodell benutzt, um die Voraussagekraft der Faktorkombinationen zu bestimmen.

| Faktor | berechnetes Risikoverhältnis | p-Wert |
|-----------------------------------|---------------------------------|--------|
| Lymphknotenstatus, 0-3 versus ≥ 4 | 2.45 | 0.12 |
| v6, negativ versus positiv | 5.56 | 0.10 |

Beispiel 2: Diagnose und Analyse von Magenkarzinomen

2.1. Tumoren und Gewebe

5 Tumorproben und Normalgewebe wurden aus den Beständen der Abteilung Pathologie der Universität Würzburg, Deutschland, ausgewählt. Die Proben waren unmittelbar nach der chirurgischen Entnahme schockgefroren und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert worden. Normalgewebe wurde von zwölf verschiedenen Tumor-Patienten sowohl aus der Korpus- als auch aus der Antrumregion des Magens entnommen. Pathologische Gewebe
10 wurden von einer Gesamtzahl von 47 Patienten mit einem Durchschnittsalter von 63 Jahren erhalten. Von den Primärkarzinomen gehörten 29 zum intestinalen und 18 zum diffusen Typ nach Lauren (1965). Die Tumorstadien reichten von lokalisiert (pT1) bis ausgedehnt (pT4), die histologische Gradierung von gut differenzierten (G1) bis schlecht differenzierten (G3) Adenokarzinomen.

15

2.2. Immunhistochemie von Magentumoren

Die Herstellung der verwendeten Antikörper sowie die Durchführung der Immunfärbungen kann Beispiel 1 entnommen werden.
20

Polyklonale Antiseren, die gegen die Epitope v3-v10 gerichtet sind (CD44v in Fig. 1), färbten 42/42 Gefrierschnitte von Magentumoren (Tabelle 3, Beispiele in Fig. 9a,b). Die Färbung war heterogen im Hinblick auf Intensität und Verteilung. Zwischen 5% und
25 100% der Tumorzellen waren mit unterschiedlicher Intensität angefärbt. Dies bestätigt den Befund von Heider *et al.* (1993), daß Adenokarzinome CD44-Spleißvarianten exprimieren. Überraschend zeigten die nachfolgenden Untersuchungen jedoch, daß sich die Feinanalyse des Expressionsmusters der verschiedenen varianten Exons zur Diagnose und/oder Analyse von Magenkarzinomen eignet. Dabei sind sowohl qualitative als auch semiquantitative
30 Schlußfolgerungen möglich.

Gefrierschnitte von Tumoren wurden mit exonspezifischen monoklonalen Antikörpern (mAbs) untersucht. Fast alle Tumoren, die positiv mit dem polyklonalen Antiserum reagierten, reagierten ebenso positiv mit einem mAb gegen ein Exon-v5-spezifisches Epitop
35 (VFF8; Tabelle 3; ein Beispiel zeigt Fig. 9f). Im Gegensatz dazu war die Reaktion mit dem v6-spezifischen Antikörper VFF4 viel stärker eingeschränkt, nur 26/42 Tumoren reagierten positiv (Tabelle 3). Mabs, die andere Exons erkannten (v3/4, v7, v8-10), banden nicht (Tabelle 3).

Überraschenderweise waren 23 der 26 VFF4-positiven Tumoren Adenokarzinome des intestinalen Typs, während 14 der 16 v6-negativen Fälle Siegelringkarzinome des diffusen Typs waren (ein Beispiel ist in Fig. 9c gezeigt). Die vorliegende Erfindung stellt somit erstmalig einen molekularen Marker zur Unterscheidung verschiedener Subtypen von Magenkarzinomen bereit.

Von 10 Patienten waren sowohl Primärtumoren als auch Lymphknotenmetastasen erhältlich. Fünf dieser Paare gehörten zum intestinalen Typ und fünf zum diffusen Typ. Epitope, die durch das polyklonale Antiserum erkannt wurden, waren sowohl auf den Primärtumoren als auch auf den Metastasen von allen 10 Tumorkomplexen präsent (Tabelle 4; Fig. 9a und b zeigen den Primärtumor Nr. 9069/90 von Tabelle 4 und die zugehörige Lymphknotenmetastase). Alle Tumorkomplexe (Primärtumoren und Metastasen) reagierten mit dem für Exon v5 spezifischen mAb VFF8. Alle Proben, die zum intestinalen Typ gehören, reagierten positiv nach Inkubation mit dem für Exon v6 spezifischen mAb VFF4, während von den Siegelringkarzinomen nur ein Paar zur VFF4⁺-Gruppe gehörte (vgl. Tabelle 4). Es wurden keine Unterschiede in der Färbungsintensität zwischen Primärtumoren und Metastasen entdeckt, noch gab es konsistente Unterschiede im Anteil von CD44v-positiven Zellen zwischen Primärtumor und Metastasen (Tabelle 4). Dies trifft insbesondere auf die Lymphknotenmetastasen der VFF4(Exon v6)-negativen Siegelringkarzinome des diffusen Typs zu, die ebenfalls nicht mit diesem mAb reagierten (Tabelle 4). Die vorliegende Erfindung stellt somit auch erstmalig ein Verfahren sowie die Mittel zu seiner Durchführung bereit, mit dem durch Analyse von Metastasen anhand molekularer Marker direkte Rückschlüsse auf den Primärtumor eines Adenokarzinoms möglich sind.

Um zu untersuchen, ob die Expression von CD44v in Adenokarzinomen, insbesondere des Magens, ein Ergebnis des Transformationsprozesses ist, oder ob CD44 bereits im Normalgewebe, z.B. des Gastrums, exprimiert wird, wurden Gefrierschnitte von normaler gastrischer Mucosa von zwölf verschiedenen Patienten durch immunhistochemische Färbung mit für CD44-Varianten spezifischen Antikörpern analysiert. Alle zwölf Proben färbten positiv mit dem polyklonalen Serum sowie mit einigen der monoklonalen Antikörper. Mit dem polyklonalen Antiserum (Exons v3-v10) und dem mAb VFF8 (Exon-Sequenz v5) wurden positive Reaktionen auf dem mucoiden Oberflächenepithel, in der foveolären Proliferationszone und in Arealen von intestinaler Metaplasie erhalten (ein Beispiel ist in Fig. 9d gezeigt). Interessanterweise reagierten diese letzteren Areale auch positiv mit VFF4 (Exon-Sequenz v6), während andere Teile des normalen Magenepithels nicht mit diesem mAb reagierten (Fig. 9c). Alle anderen mAbs (VFF11, VFF9, VFF14; Epitopspezifität vgl. Fig. 1) reagierten nicht. In bestimmten Bereichen der Magenmucosa wird also eine Spleißvariante von CD44 exprimiert, die die Exonsequenz v5 trägt, und die deshalb in der Expression

den Zellen von Karzinomen des diffusen Typs ähnelt. Bereiche der Magenmucosa, die durch intestinale Metaplasien gekennzeichnet sind, tragen dagegen Epitope beider Exons v5 und v6 und sind in der Expression daher Karzinomen vom intestinalen Typ ähnlich. Diese Befunde unterstützen die These, daß die Tumoren von diesen jeweiligen Zelltypen abstammen und das Expressionsmuster der Zellen aufrechterhalten, von denen sie abstammen. Die vorliegende Erfindung macht solche Analysen von Adenokarzinomen, insbesondere des Magens, erstmalig möglich.

Tabelle 3: Expression von varianten CD44-Epitopen auf den Zelloberflächen von Magentumoren

| | Serum ¹ | Monoklonale Antikörper | | | | |
|------------------|----------------------------|------------------------|--------------|--------------|--------------|------------------|
| Adenokarzinome | α CD44v (v3-v10) | VFF11 (v3/4) | VFF8 (v5) | VFF4 (v6) | VFF9 (v7) | VFF14 (v8-10) |
| Diffuser Typ | 17/17 ² | 0/17 | 14/17 | 3/17 | 0/17 | 0/17 |
| Intestinaler Typ | 25/25 | 0/25 | 25/25 | 23/25 | 0/25 | 0/25 |
| Gesamt | 42/42 | 0/42 | 39/42 | 26/42 | 0/42 | 0/42 |

¹ polyklonales Antiserum

² Zahl positiver Tumoren/Zahl der untersuchten Tumoren

Tabelle 4: Expression von varianten CD44-Epitopen in Primärtumoren des Magens und den entsprechenden Lymphknotenmetastasen

| Antikörperspezifität | | | | | | |
|-----------------------------|--------------------|------------------------------------|------------------------|----------------------|------------|----------------------|
| Adenokarzinome ³ | polyklonales Serum | | monoklonale Antikörper | | | |
| | anti CD44v | | VFF8 (v5) | | VFF4 (v6) | |
| | Intensität | pos. Zellen PT/LN | Intensität | pos. Zellen PT/LN | Intensität | pos. Zellen PT/LN |
| Diffuser Typ | | | | | | |
| 645/89 | ++ ⁴ | 100 ⁵ /100 ⁶ | ++ | 20/90 | - | 0/0 |
| 12589/89 | ++ | 40/50 | ++ | 80/90 | - | 0/0 |
| 12924/89 | ++ | 70/80 | ++ | 40/30 | - | 0/0 |
| 25501/89 | ++ | 90/70 | ++ | 70/70 | ++ | 30/30 |
| 33383/89 | ++ | 80/30 | ++ | 40/20 | - | 0/0 |
| Intestinaler Typ | | | | | | |
| 32761/88 | ++ | 60/10 | + | 10/20 | + | 20/90 |
| 33295/88 | ++ | 90/10 | ++ | 80/60 | + | 40/40 |
| 9891/89 | +++ | 100/80 | ++ | 70/70 | ++ | 20/5 |
| 18352/89 | +++ | 90/90 | +++ | 90/80 | ++ | 70/50 |
| 9069/90 | ++ | 90/90 | ++ | 60/60 | + | 20/80 |

5 PT= Primärtumor; LN= Lymphknotenmetastasen

2.3. Western-Blot-Analyse

10

Zellen wurden durch Ultraschall lysiert und in SDS-Gel-Probenpuffer 3 min. gekocht (Lämmli, 1970). Gleiche Proteinmengen (ermittelt durch Färbung des Gels mit Coomassie Brilliant Blue) wurden elektrophoretisch in einem denaturierenden 6%igen Polyacrylamidgel

³ Die Zahlen beziehen sich auf Tumoren und die entsprechenden Lymphknotenmetastasen (nicht getrennt angezeigt). Die Tumoren sind in der Sammlung enthalten, die in Tabelle 1 dargestellt wurde.

⁴ Intensität (weil es keinen Unterschied in der Intensität zwischen Primärtumor und Lymphknotenmetastase gab, ist hier die gemeinsame Färbung angezeigt: - negativ, + schwach, ++ mäßig, +++ stark)

⁵ Prozentsatz positiver Tumorzellen im Primärtumor

⁶ Prozentsatz positiver Tumorzellen in einer Lymphknotenmetastase des gleichen Patienten

aufgetrennt (Lämmli, 1970). Die Proteine wurden auf Polyvinyliden Difluorid-Membran (Millipore, Eschborn, Deutschland) übertragen, wobei ein Transblot-Gerät (BIO-RAD Laboratories, München, Deutschland) verwendet wurde. Unspezifische Wechselwirkungen wurden durch Präinkubation der Membranen mit einer Milchpulversuspension (10% 5 Trockenmilchpulver in PBS) blockiert. Die Membranen wurden dann bei Raumtemperatur mit dem polyklonalen anti-CD44-Antiserum (vgl. Fig. 1) inkubiert, gefolgt von einer weiteren Inkubation mit mit alkalischer Phosphatase konjugiertem Ziegen-anti-Kaninchen-IgG (Amersham, Braunschweig, Deutschland). Die Inkubationszeit betrug jeweils eine Stunde. Nach jeder Antikörperinkubation wurden die Membranen mit PBS gewaschen, das 0.3% 10 Tween 20 (Sigma) enthielt. Die Bindung der Antikörper wurde unter Verwendung eines Enhanced Chemoluminescent System (Amersham) nachgewiesen.

2.4. Reverse Transkription /PCR-Amplifikation

15

Um zu untersuchen, ob die Expressionsmuster der Spleißvarianten in normalem Gewebe und in Tumorgewebe gleich oder unterschiedlich sind, wurde RNA von Normalgewebe und aus Tumoren isoliert, revers transkribiert, durch PCR amplifiziert und mit Exon-spezifischen Proben hybridisiert. Für die PCR wurden Primer benutzt, die auf der 5'- bzw. 3'-Seite der Insertionsstelle der varianten Exons lokalisiert sind. 20

2 µg Gesamt-RNA (aus Geweben) oder polyA⁺-RNA (aus Zelllinien) wurden isoliert und revers transkribiert, wie in der Literatur beschrieben (Günthert *et al.*, 1991). 5 µl der Erststrang-cDNA wurden mit *Taq*-Polymerase (Amersham) in 50 µl unter den vom Hersteller empfohlenen Pufferbedingungen amplifiziert. Für die GAPDH-PCR wurden Oligonukleotide verwendet, die zu den Positionen 8-29 und 362-339 der publizierten cDNA-Sequenz (Allen *et al.*, 1987) homolog waren. Nach 26 Amplifikationsrunden (95°C für 1 min., 62°C für 1 min., 72°C für 2.5 min.) wurden 10 µl des Reaktionsansatzes in einem 1.4%igen Agarosegel aufgetrennt und das Amplifikationsprodukt nach Färbung mit Ethidiumbromid unter UV-Licht visualisiert. Zur Amplifikation der varianten CD44-Transkripte wurden Primer verwendet, die homolog zu den Positionen 513-540 (5'-oligo) und 900-922 (3'-oligo) der publizierten menschlichen CD44-Sequenz (Stamenkovic *et al.*, 1989) waren. Nach 36 Amplifikationsrunden (94°C für 1 min., 62°C für 1 min., 72°C für 2.5 min.) wurden 10 µl des Reaktionsansatzes in einem Agarosegel aufgetrennt, nach Färbung des Gels mit Ethidiumbromid unter UV-Licht visualisiert und anschließend auf Nylon-Membranen für die Durchführung der Southern Blots (vgl. Fig. 10 und 12 sowie die zugehörigen Abbildungstexte) nach Standardprotokollen (Sambrook *et al.*, 1985) übertragen. 35

Durch Ethidiumbromidfärbung von Agarosegelen wurde sowohl in Proben aus normaler Mucosa als auch in Tumorproben ein dominantes PCR-Produkt detektiert, das nach seiner Größe der Form CD44s entsprach. PCR-Produkte geringerer Prominenz wurden nach Übertragung auf Nylonmembranen und Hybridisierung mit Exon-spezifischen Proben nachgewiesen (Fig. 10). Durch Hybridisierung mit einer v5-spezifischen bzw. einer v6-spezifischen Probe wurde die Expression von Exon v5 bzw. v6 enthaltender RNA nachgewiesen. Es ergab sich eine deutliche Differenz im Muster der RNA, die in normalem Gewebe und in Tumoren exprimiert wurde. Die RNA-Muster unterschieden sich ferner von Tumor zu Tumor.

10

RNA von 10 der 12 Proben von normaler Magenmucosa, die auch in der Immunhistochemie untersucht worden waren, ergab zwei dominante Banden, die mit Exons v6 hybridisierten, und zwei dominante Banden ähnlicher Größe, die mit Exon v5 hybridisierten (vier repräsentative Beispiele sind in Fig. 10A und B gezeigt). RNA aus Tumorproben ergab ein komplexeres und variables Muster der Spleißprodukte. Die Tumoren enthielten zumindest teilweise auch größere Spleißvarianten bis zu einer Größe, die die Anwesenheit aller varianten Exonsequenzen vermuten läßt (Fig. 10). Offensichtlich waren nicht alle der durch diese Exons kodierten Epitope der Immunhistochemie zugänglich. Sowohl Tumoren vom diffusen als auch vom intestinalen Typ zeigten starke Expression von Transkripten, die Exon v5 enthielten (Fig. 10A, Spuren 1-5). Allerdings gab es einen klaren Unterschied zwischen Tumoren vom diffusen und vom intestinalen Typ, was die Hybridisierung mit der Exon-v6-spezifischen Probe betraf. Während in allen vier Proben vom intestinalen Typ Amplifizierungsprodukte nachgewiesen werden konnten, die Exon v6 enthielten (vgl. Fig. 10B, Spuren 1-4), zeigte die Probe eines Tumors vom diffusen Typ fast keine Hybridisierung mit der v6-spezifischen Probe (Fig. 10B, Spur 5). Die vorliegende Erfindung gestattet somit Diagnose und Analyse von Adenokarzinomen anhand molekularer Marker auf Nukleinsäureebene, und stellt die Mittel dafür zur Verfügung. Insbesondere gestattet das erfindungsgemäße Verfahren die Unterscheidung von Magenkarzinomen vom diffusen und vom intestinalen Typ sowie die Analyse der entsprechenden Metastasen auf Nukleinsäureebene.

30

Beispiel 3: Diagnose und Analyse von Kolonkarzinomen

3.1. Tumoren und Gewebe

5 Normale und pathologische Gewebe wurden aus den Beständen der Abteilung für Pathologie, Academic Medical Center, Universität Amsterdam, Niederlande, entnommen. Kolorektale Karzinome (n=39) wurden nach der Klassifikation von Dukes (1937, 1980) in Stadien eingeteilt, in Dukes A (n=9), Krankheit beschränkt auf die Darmwand; Dukes B (n=14), Ausdehnung über die Muskelschicht hinaus ohne Metastasierung; Dukes C/D
10 (n=16), Tumoren mit regionalen bzw. Fernmetastasen. Adenome wurden unterteilt in frühe Adenome (Durchmesser < 1 cm, n=11) und späte Adenome (Durchmesser > 1 cm, n=12) und wurden als niedrig oder hoch differenziert nach Standardkriterien gradiert.

15 3.2. Immunhistochemie von Kolonkarzinomen

Die Herstellung der verwendeten Antikörper sowie die Durchführung der Immunfärbungen kann Beispiel 1 entnommen werden.

20 Untersucht wurde eine Gesamtzahl von 70 normalen und pathologischen Kolonproben. Tumoren wurden als "positiv" bezeichnet, wenn mehr als 10% der Tumorzellen angefärbt waren. Waren weniger als 10% der Tumorzellen gefärbt, wurde dies als "fokal" bezeichnet.

25 Die immunhistochemische Untersuchung von Gewebeproben ergab eine differentielle Expression von varianten CD44-Proteinen in normaler kolorektaler Mucosa, adenomatösen Polypen und kolorektalen Karzinomen (Fig. 13). Im normalen Kolonepithel ist die Expression von CD44-Proteinen begrenzt. Nur eine schwache Färbung an der Kryptenbasis zeigte sich in der Anfärbung mit einem monoklonalen Antikörper (mAb NKI-P1) gegen den
30 N-terminalen konstanten Anteil von CD44. Ein ähnliches Expressionsmuster wurde für die Epitope beobachtet, die durch die Exons v8-v10 kodiert werden.

Expression anderer varianter Exons (v3-v6) war in normalem Kolonepithel nicht nachweisbar (Fig. 13). Wie das normale Kolonepithel, so exprimieren kolorektale Tumoren
35 ebenfalls Spleißvarianten, die die Exons v8-v10 enthalten. Die Expression ist jedoch viel stärker und nicht mehr auf die Krypten begrenzt. Darüber hinaus werden in Tumoren zusätzliche Varianten gefunden, die im normalen Kolonepithel nicht vorhanden sind. Diese Überexpression und zunehmende Vielfalt von CD44-Varianten wird bereits in sehr frühen

Stadien der kolorektalen Tumorprogression beobachtet, z.B. in frühen Adenomen, die zusätzlich zu den Exons v8-v10 zum größten Teil CD44-Isoformen exprimieren, die v5 enthalten (Fig. 13). In weiter fortgeschrittenen Stadien der kolorektalen Tumorprogression, z.B. in fortgeschrittenen Polypen und invasiven Karzinomen, nimmt das Ausmaß der Expression von v5-enhaltenden CD44-Varianten zu. Überraschend war jedoch, daß die Tumorprogression stark mit der Expression v6 enthaltender CD44-Isoformen korrelierte (Fig. 13): Expression dieses Exons war nachweisbar in keiner der normalen Kolonproben, in 9% der frühen Polypen, in 45% der fortgeschrittenen Polypen und in 67% der invasiven Karzinome. (Chi-square 1df $p < 0.0001$). Darüber hinaus war die Expression von v6 in Karzinomen signifikant korreliert zum Dukes-Stadium. Während der Anteil positiver Proben in den nicht-metastatischen Dukes A und B Tumoren 52% betrug, war er 83% in der metastatischen Dukes C/D-Gruppe (Chi-square 1df $p < 0.05$). Zusätzlich konnte beobachtet werden, daß die Überexpression v6 enthaltender CD44-Isoformen während der Tumorprogression nicht nur durch die steigende Zahl positiver Fälle reflektiert wird, sondern auch durch eine zunehmende Zahl positiver Zellen innerhalb eines Tumor sowie durch ein höheres Expressionsniveau (stärkere Anfärbung der Zellen). Die fokale Expression von v6 in Adenomen war mit einem weiteren Parameter der Tumorprogression korreliert, dem histologischen Tumorgrad, wobei in keinem von 17 Adenomen mit niedrigem, jedoch 5 von 6 Adenomen mit hohem Grad v6-Expression positiv war.

20

Informationen über die v6-Expression, wie sie z.B. durch routinemäßige Immunhistochemie erhalten werden können, können also wegen des überraschenden Zusammenhangs speziell der v6-Expression mit dem Tumorstadium wertvolle Erkenntnisse für Diagnose und Prognose von Kolonkarzinomen ermöglichen.

25

Beispiel 4: Diagnose und Analyse von Zervixkarzinomen

4.1. Tumor- und Normalgewebeproben

30

Tumor- und Normalgewebeproben des Gebärmutterhalses wurden von der Abteilung für Gynäkologie der Universität Heidelberg (Deutschland) zur Verfügung gestellt. Alle Proben wurden sofort nach der chirurgischen Entnahme in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Verwendung bei -80°C aufbewahrt. 5 Normalproben wurden von Patienten erhalten, an denen eine totale Hysterektomie im Zusammenhang mit nichtneoplastischen Erkrankungen vorgenommen wurde. 16 Zervixkarzinomproben (15 Plattenepithelkarzinome

35

und 1 Adenokarzinom) wurden ebenfalls untersucht. Die Stadien der Tumoren reichten vom FIGO-Stadium Ib (n=7) über Stadium IIb (n=5) bis zum Stadium IIIb (n=4).

5 4.2. Immunhistochemie von Zervixkarzinomen

Die Herstellung der verwendeten Antikörper sowie die Durchführung der Immunfärbungen kann Beispiel 1 entnommen werden.

10 16 Zervixkarzinome und 5 Proben von normalem Zervixepithel wurden im Hinblick auf die Oberflächenexpression von N-terminalen und varianten Epitopen von CD44 (Fig. 1) und im Hinblick auf CD44-mRNA durch RT-PCR untersucht. Diese Daten erlauben Schlußfolgerungen im Hinblick sowohl auf (a) normale Differenzierung des Zervixepithels als auch (b) Karzinogenese.

15

(a) *Epitheliale Differenzierung.* N-terminale Epitope sind auf den subepithelialen Stromazellen und in allen epithelialen Schichten präsent (Fig. 14G). Die Präsenz von N-terminalen Epitopen zeigt CD44-Promotor-Aktivität in allen Stromazellen und epithelialen Schichten an. Epitope varianter Exons treten in Stromazellen nicht auf, werden jedoch in
20 Epithelzellen stark exprimiert. Allerdings gehen diese Epitope in Richtung der epithelialen Oberfläche verloren und fehlen im *stratum superficiale* (Fig. 14A,C). Ein Epitop, das von dem Übergangsstück von Exons v7 und v8 gebildet wird und das von dem mAb VFF17 (*anti-v7/v8*) erkannt wird, fehlt völlig im normalen Epithel (Fig. 14E). Das Muster der Immunfärbung kann so interpretiert werden, daß es die Oberflächenexpression von einer oder
25 mehreren CD44-Isoformen mit regulierter Zugänglichkeit der Epitope (z.B. durch Glykosylierung) oder mit regulierter Synthese durch alternatives Spleißen anzeigt. Dabei ist die Kombination der Exons v7/v8, die durch das Auftreten des Übergangsepitops angezeigt wird, ausgeschlossen. Die O-Glykosylierungsstelle in der Nähe 5'-Endes von Exon v8 (Günthert *et al.*, 1991; Screaton *et al.*, 1992) könnte für die Nichtzugänglichkeit des Epi-
30 tops für den Antikörper verantwortlich sein. Regulierte Synthese von CD44-Isoformen, die variante Exons enthalten, wurde in aktivierten Lymphozyten und Hautkeratinozyten beschrieben (Arch *et al.*, 1992). Im Zervixepithel zeigen die hochaktiven und stark proliferierenden Basalzellen die stärkste CD44v-Expression, während die mehr ruhenden Oberflächenzellen dies nicht tun, obwohl Promotoraktivität besteht, wie der Nachweis des N-terminalen Epitops zeigt. Deshalb repräsentieren diese Unterschiede Veränderungen beim
35 Spleißen oder bei der Glykosylierung.

(b) *Karzinogenese*. Im deutlichen Kontrast zum normalen Epithel zeigen 15 von 16 Proben von Zervixtumoren das v7/v8-Übergangsepitop (Fig. 14F). Dies zeigt an, daß entweder eine dramatische Änderung in der Modifikation der Epitope oder, und dies ist wahrscheinlicher, eine dramatische Änderung im Spleißmuster auftritt. Obwohl die Immunfärbung nur semiquantitativ ist, zeigen ferner Antikörper-Verdünnungsexperimente, daß CD44-Expression in allen Krebszellen gegenüber normalem Epithel verstärkt ist.

Informationen über die kombinierte Expression der Exons v7 und v8, wie sie z.B. durch Nachweis des Übergangsepitops durch routinemäßige Immunhistochemie erhalten werden können, können also wegen des überraschenden Auftretens dieser kombinierten Expression in Tumor-, nicht jedoch in Normalgewebe wertvolle Erkenntnisse für Diagnose und Prognose von Zervixkarzinomen ermöglichen.

4.3. Reverse Transkription / PCR-Amplifikation

Um herauszufinden, ob alternatives Spleißen nachgewiesen werden kann, wurden RNAs durch semiquantitative RT-PCR analysiert.

3 µg Gesamt-RNA (isoliert aus Tumor- oder Normalgewebe) wurden isoliert und revers transkribiert, wie früher beschrieben (Günthert *et al.*, 1991). 5 µl der Erststrang-cDNA wurden mit *Taq*-Polymerase (Amersham) in einem Volumen von 50 µl in *Taq*-Polymerase-Puffer (Amersham) amplifiziert. Für die Glycerinaldehyd-Phosphat-Dehydrogenase-PCR wurden Oligonukleotide verwendet, die zu den Positionen 8-29 und 362-339 der publizierten cDNA-Sequenz (Allen *et al.*, 1987) homolog waren. Für die Amplifikation der varianten CD44-Transkripte wurden Primer verwendet, die zu den Positionen 513-540 und 934-958 der publizierten menschlichen CD44-Sequenz (Stamenkovic *et al.*, 1991) homolog waren. Nach 25 (GAPDH) bzw. 30 (CD44) Amplifikations-Zyklen (1 Minute bei 94°C, 1 Minute bei 62°C, 2.5 Minuten bei 72°C) wurden 10 µl des Reaktionsansatzes in einem 1.2%igen Agarosegel aufgetrennt. Die Amplifikationsprodukte wurden nach Ethidiumbromid-Färbung sichtbar gemacht und die CD44-Produkte danach für Southern-Blotting auf Nylonmembranen (Hybond-N+, Amersham) transferiert. ³²P-markierte Hybridisierungsproben wurden mit PCR synthetisiert, wobei CD44v-Exon-spezifische Primer verwendet wurden, die zu den Positionen 24-53/81-110 (v3), 128-154/213-239 (v4), 243-271/327-356 (v5), 357-383/456-482 (v6), 489-515/585-614 (v7), 621-647/692-718 (v8), 722-750/779-808 (v9) und 812-838/987-1013 (v10) (Hofmann *et al.*, 1991) homolog waren.

Hybridisierung mit Proben für variante Exons bei langer Exposition dokumentieren die Präsenz alternativ gespleißter langer CD44-Transkripte in den RNA-Proben (Fig. 15). Das größte Fragment, das in allen Proben vorkommt, 850 minus 440 Basenpaare, könnte 3-4 variante Exon-Sequenzen tragen. Möglicherweise kodiert diese RNA-Spezies CD44 v3-v6 oder v4-v7. Zusätzlich ist wenigstens eine andere Spezies vorhanden, die sogenannte epitheliale Variante CD44v8-v10 (ebenfalls mit einer Transkriptlänge von 850 bp). Diese Daten stützen die Annahme, daß eine CD44-Isoform, die gleichzeitig v7 und v8 enthält, nicht existiert, und sprechen für die Abwesenheit des Übergangsepitops (v7/v8). Die Quelle der CD44s-RNA kann nicht eindeutig definiert werden.

PCR-Daten zeigen, daß fast alle Proben von malignem Gewebe RNA für CD44-Spleißvarianten enthalten (Fig. 16). Die Spuren 6 und 9 von Fig. 4 repräsentieren Proben mit nur einer kleinen Zahl von Tumorzellen. Deswegen war die zu erwartende Menge an CD44v-RNA zu gering, um ausreichend amplifiziert zu werden. Allerdings zeigten die Tumorzellen starke Expression varianter Epitope in der Immunfärbung. Die Ethidiumbromidfärbung dokumentiert die relative Häufigkeit von PCR-Produkten in Tumورproben im Vergleich zu Proben von normalem Epithel (Intensitätsunterschied der Hybridisierungssignale 20fach) (Fig. 15). Es ist zu beachten, daß die Bande, die CD44s darstellt, aus RNA von Tumorzellen oder Stromazellen stammen könnte. Die relative Häufigkeit varianter Exon-Sequenzen war von Probe zu Probe unterschiedlich. Interessanterweise waren unter den Proben mit der stärksten Expression und der größten Anzahl unterschiedlicher Isoformen diejenigen von Patienten, die zum Zeitpunkt der Operation bereits Lymphknotenmetastasen hatten.

Eine große mRNA-Spezies (1440 minus 440 Basenpaare der varianten Domäne), die einer Isoform von CD44 mit Exons v3-v10 entsprechen könnte, wurde in den in dieser Studie untersuchten Zervixkarzinomen häufig produziert. Dieses könnte die Isoform sein, die das v7/v8-Übergangsepitop enthält. Zusätzlich waren verschiedene kleinere Isoformen detektierbar, wobei das Hybridisierungsmuster sowohl CD44v3-v7, CD44v8-v10, als auch andere Varianten repräsentieren könnte. Es kann gefolgert werden, daß Zervixkarzinome eine zweifache Veränderung der CD44 Expression zeigen: Verstärkung der Produktion von CD44-Spleißvarianten sowie eine Änderung des Spleißmusters, die zum Erwerb eines neuen (Übergangs-)Epitops führt. Obwohl es noch nicht klar ist, welche molekularen Funktionen die verschiedenen Spleißvarianten erfüllen, scheint die Veränderung im Spleißmuster einen selektiven Vorteil zu vermitteln.

Literatur

- Allen, R.W., Trach, K.A., and Hoch, J.A. Identification of the 37kDa protein displaying a variable interaction with the erythroid cell membrane as glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* 262: 649-652 (1987).
- Angel P., Allegretto, E.A., Okuio, S.T., Hatton, K., Boyle, W.J., Hunter, T., Karin, M. Oncogene *jun* encodes a sequence-specific trans-activator similar to AP-1. *Nature* 332: 166 (1988).
- Arch, R., Wirth, K., Hofmann, M., Ponta, H., Matzku, S., Herrlich, P., and Zöller, M. Participation in normal immune responses of a splice variant of CD44 that encodes a metastasis-inducing domain. *Science* 257: 682-685 (1992).
- Brady, L.W., Perez, C.A., Bedwinnek, J.M. Failure patterns in gynecologic cancer. *Int. J. Rad. Oncol. Biol. Phys.* 12: 549-557 (1986).
- Catty, D (Hrsg). *Antibodies Vols. I und II*. IRL Press Oxford (1989).
- Catty, D., Raykundalia, C. ELISA and related immunoassays. In: Catty, D (Hrsg). *Antibodies Vol. II*. IRL Press Oxford (1989), 97-152, s. S. 105-109.
- Catty, D., Murphy, G. Immunoassays using radiolabels. In: Catty, D (Hrsg). *Antibodies Vol. II*. IRL Press Oxford (1989), 77-96.
- Diehl, I. J., Kaufmann, M., Goerner R., Costa, S. D., Kaul, S., Bastert, G. Detection of tumor cells in bone marrow of patients with primary breast cancer: A prognostic factor for distant metastasis. *J. Clin. Oncol.* 10: 1534-1539 (1992).
- Fisher, E. R., Redmond, C., Fisher, B., Bass, G. Pathologic findings from the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Projects (BSABP). Prognostic discriminants for 8-year survival for node-negative invasive breast cancer patients. *Cancer* 65: 2121-2128 (1990).
- Günthert, U., Hofmann, M., Rudy, W., Reber, S., Zöller, M., Haußmann, I., Matzku, S., Wenzel, A., Ponta, H., and Herrlich, P. A new variant of glycoprotein CD44 confers metastatic potential to rat carcinoma cells. *Cell* 65: 13-24 (1991).

- Heider, K.-H., Hofmann, M., Horst, E., van den Berg, F., Ponta, H., Herrlich, P., and Pals, S.T. A human homologue of the rat metastasis-associated variant of CD44 is expressed in colorectal carcinomas and adenomatous polyps. *J. Cell Biol.* 120: 227-233 (1993).
- 5 Hofmann, M., Rudy, W., Zöller, M., Tölg, C., Ponta, H., Herrlich P., and Günthert, U. CD44 splice variants confer metastatic behavior in rats: homologous sequences are expressed in human tumor cell lines. *Cancer Res.* 51: 5292-5297 (1991).
- Jass, J.R. A classification of gastric dysplasia. *Histopath.* 7: 181-193 (1983).
- 10 Jida, F., and Kusama, J. Gastric and intestinal metaplasia. Significance of type of intestinal metaplasia upon development of gastric carcinoma. *Cancer* 50: 2854-2858 (1982).
- Kato, Y., Kiagawa T., Nakamura, K., and Sugano, H. Changes in the histologic types of gastric carcinoma in Japan. *Cancer* 48: 2084-2087 (1981).
- 15 Kearney, J.F., Radbruch A., Liesegang B., Rajewski K. A new mouse myeloma cell line that has lost immunoglobulin expression but permits construction of antibody-secreting hybrid cell lines. *J. Immunol.* 123: 1548 (1979).
- 20 Köhler, G., Milstein, C. Continuous culture of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 265: 495 (1975).
- Koopman, G., Heider, K.-H., Horts, E., Adolf, G. R., van den Berg, F., Ponta, H., Herrlich, P., Pals, S. T. Activated human lymphocytes and aggressive Non-Hodgkin's lymphomas express a homologue of the rat metastasis-associated variant of CD44. *J. Exp. Med.* 177: 897-904 (1993).
- 25 Laemmli, U. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685 (1970).
- 30 Lauren P. The two histological main types of gastric carcinoma: diffuse and so-called intestinal-type carcinoma. *Acta Path. Microbiol. Scand.* 64: 31-49 (1965).
- 35 Mackay, C. R., Terpe, H.-J., Stauder, R., Marston, W. L., Stark, H., Günthert U. Expression and modulation of CD44 variant isoforms in humans. *J. Cell Biol.* 124: 71-82 (1994).

- Mayer, B., Jauch, K.W., Günthert, U., Figdor, C.G., Schildberg, F.W., Funke, I., Johnson, J.P. De-novo expression of CD44 and survival in gastric cancer. *Lancet* 342: 1019-1022 (1993).
- 5 Nomura, A., Stemmermann, G.N., Chyon, P.H., Kato, I., Perez-Perez, G.I. and Blaser, H.J. *Helicobacter pylori* infection and gastric carcinoma among Japanese americans in Hawaii. *New Engl. J. Med.* 325: 1132-1136 (1991).
- 10 Park, R.C., Thigpen, J.T. Chemotherapy in advanced and recurrent cervical cancer. *Cancer* 71: 1446-1450 (1993).
- 15 Parsonnet, J., Friedman, G.D., Vandersteen, D.F., Chang, Y., Vogelman, J.H., Orentreich, N., and Sikley, R.K. *Helicobacter pylori* infection and the risk of gastric carcinoma. *New Engl. J. Med.* 325: 1127-1131 (1991).
- Perez, C.A., Breaux, S., Madoo-Jones, H., Bedwinek, J.M., Camel, H.M., Purdy, J.A., Walz, B.J. Radiation therapy alone in the treatment of carcinoma of uterine Zervix. *Cancer* 51: 1393-1402 (1983).
- 20 Petterson, F. Annual report on results of treatment in gynecologic cancer. *FIGO Cancer Comitees: Vol. 20* (1988).
- Piper, D.W. Stomach cancer. In: "Geneva: International Union Against Cancer". *UICC Technical Report Series Vol. 34* (1978).
- 25 Sambrook, J., Fritsch E.E., Maniatis I., *Molecular cloning*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (1989).
- 30 Screaton, G.R., Bell, M.V., Jackson, D.G., Cornelis, F.B., Gerth, U., and Bell, J. I. Genomic structure of DNA encoding the lymphocyte homing receptor CD44 reveals at least 12 alternatively spliced exons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89: 12160-12164 (1992).
- Sipponen, P., Kekki, M., and Surala, M. Atrophic chronic gastritis and intestinal metaplasia in gastric carcinoma. Comparison with a representative population sample. *Cancer* 52: 1062-1068 (1983).
- 35 Siurala, M., Lehtola, J., and Ihamäki, T. Atrophic gastritis and its sequelae. Results of 15-23 years follow-up. *Scand. J. Gastroenterol.* 1: 40-48 (1974).

- Smith, D.B., Johnson, K.S. Single-step purification of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. *Gene* 67: 31 (1988).
- 5 Stamenkovic, I., Amiot, M., Pesando, J.M., and Seed, B.A lymphocyte molecule implicated in lymph node homing is a member of the cartilage link protein family. *Cell* 56: 1057-1062 (1989).
- 10 Strickland, R.G., and Mackay, I.R.A reappraisal of the nature and significance of chronic atrophic gastritis. *Dig. Dis. Sci.* 18: 426-440 (1973).
- Tölg, C., Hofmann, M., Herrlich, P., and Ponta, H. Splicing choice from ten variant exons establishes CD44 variability. *Nucleic Acids. Res.* 21: 1225-1229 (1993).
- 15 Thomas, G. D., Dykes, P. W., Bradwell, A. R. Antibodies for tumour immunodetection and methods for antibody radiolabeling. In: Catty, D. (Hrsg.). *Antibodie Vol. II*. IRL Press Oxford , 223-244 (1989).

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALGEMEINE INFORMATION:

(i) ANMELDER:

- (A) NAME: Boehringer Ingelheim International GmbH
(B) STRASSE: Binger Strasse
(C) ORT: Ingelheim
(E) LAND: Deutschland
(F) POSTLEITZAHL: 55218
(G) TELEPHON: 49-6132-772770
(H) TELEFAX: 49-6132-4473

- (A) NAME: Kernforschungszentrum Karlsruhe GmbH
(B) STRASSE: Postfach 3640
(C) ORT: Karlsruhe
(E) LAND: Deutschland
(F) POSTLEITZAHL: 76021

(ii) ANMELDETITEL: Verfahren zur Diagnose und Analyse von Tumoren

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 12

(iv) COMPUTER-LESBARE FORM:

- (A) DATENTRÄGER: Floppy disk
(B) COMPUTER: IBM PC compatible
(C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
(D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.25 (EPA)

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 120 Basenpaare
(B) ART: Nukleinsäure
(C) STRANGFORM: Doppel
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNS (genomisch)

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
(B) LAGE: 3..119

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: exon
(B) LAGE: 1..120

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

| | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| CA | GAT | GTA | GAC | AGA | AAT | GGC | ACC | ACT | GCT | TAT | GAA | GGA | AAC | TGG | AAC | 47 |
| Asp | Val | Asp | Arg | Asn | Gly | Thr | Thr | Ala | Tyr | Glu | Gly | Asn | Trp | Asn | | |
| 1 | | | | 5 | | | | | 10 | | | | | 15 | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | |
| CCA | GAA | GCA | CAC | CCT | CCC | CTC | ATT | CAC | CAT | GAG | CAT | CAT | GAG | GAA | GAA | 95 |
| Pro | Glu | Ala | His | Pro | Pro | Leu | Ile | His | His | Glu | His | His | Glu | Glu | Glu | |
| | | | | 20 | | | | | 25 | | | | | 30 | | |
| | | | | | | | | | | | | | | | | |
| GAG | ACC | CCA | CAT | TCT | ACA | AGC | ACA | A | | | | | | | | 120 |
| Glu | Thr | Pro | His | Ser | Thr | Ser | Thr | | | | | | | | | |

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 39 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

```

Asp Val Asp Arg Asn Gly Thr Thr Ala Tyr Glu Gly Asn Trp Asn Pro
 1           5           10           15
Glu Ala His Pro Pro Leu Ile His His Glu His His Glu Glu Glu Glu
          20           25           30
Thr Pro His Ser Thr Ser Thr
          35

```

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 3:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 129 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Doppel
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNS (genomisch)

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- (B) LAGE: 3..128

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: exon
- (B) LAGE: 1..129

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

```

TC CAG GCA ACT CCT AGT AGT ACA ACG GAA GAA ACA GCT ACC CAG AAG      47
  Gln Ala Thr Pro Ser Ser Thr Thr Glu Glu Thr Ala Thr Gln Lys
   1           5           10           15
GAA CAG TGG TTT GGC AAC AGA TGG CAT GAG GGA TAT CGC CAA ACA CCC      95
Glu Gln Trp Phe Gly Asn Arg Trp His Glu Gly Tyr Arg Gln Thr Pro
          20           25           30
AGA GAA GAC TCC CAT TCG ACA ACA GGG ACA GCT G      129
Arg Glu Asp Ser His Ser Thr Thr Gly Thr Ala
          35           40

```

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 4:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 42 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (D) TOPOLOGIE: linear

35

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

Gln Ala Thr Pro Ser Ser Thr Thr Glu Glu Thr Ala Thr Gln Lys Glu
 1 5 10 15
 Gln Trp Phe Gly Asn Arg Trp His Glu Gly Tyr Arg Gln Thr Pro Arg
 20 25 30
 Glu Asp Ser His Ser Thr Thr Gly Thr Ala
 35 40

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 5:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 132 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Doppel
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNS (genomisch)

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- (B) LAGE: 3..131

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: exon
- (B) LAGE: 1..132

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

CA GCC TCA GCT CAT ACC AGC CAT CCA ATG CAA GGA AGG ACA ACA CCA 47
 Ala Ser Ala His Thr Ser His Pro Met Gln Gly Arg Thr Thr Pro
 1 5 10 15
 AGC CCA GAG GAC AGT TCC TGG ACT GAT TTC TTC AAC CCA ATC TCA CAC 95
 Ser Pro Glu Asp Ser Ser Trp Thr Asp Phe Phe Asn Pro Ile Ser His
 20 25 30
 CCC ATG GGA CGA GGT CAT CAA GCA GGA AGA AGG ATG G 132
 Pro Met Gly Arg Gly His Gln Ala Gly Arg Arg Met
 35 40

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 6:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 43 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6:

Ala Ser Ala His Thr Ser His Pro Met Gln Gly Arg Thr Thr Pro Ser
 1 5 10 15
 Pro Glu Asp Ser Ser Trp Thr Asp Phe Phe Asn Pro Ile Ser His Pro

36

20

25

30

Met Gly Arg Gly His Gln Ala Gly Arg Arg Met
 35 40

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 7:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 102 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Doppel
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNS (genomisch)

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
- (B) LAGE: 3..101

(ix) MERKMALE:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: exon
- (B) LAGE: 1..102

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 7:

| | |
|--|-----|
| AT ATG GAC TCC AGT CAT AGT ACA ACG CTT CAG CCT ACT GCA AAT CCA | 47 |
| Met Asp Ser Ser His Ser Thr Thr Leu Gln Pro Thr Ala Asn Pro | |
| 1 5 10 15 | |
| AAC ACA GGT TTG GTG GAA GAT TTG GAC AGG ACA GGA CCT CTT TCA ATG | 95 |
| Asn Thr Gly Leu Val Glu Asp Leu Asp Arg Thr Gly Pro Leu Ser Met | |
| 20 25 30 | |
| ACA ACG C | 102 |
| Thr Thr | |

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 8:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 33 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 8:

| | |
|--|--|
| Met Asp Ser Ser His Ser Thr Thr Leu Gln Pro Thr Ala Asn Pro Asn | |
| 1 5 10 15 | |
| Thr Gly Leu Val Glu Asp Leu Asp Arg Thr Gly Pro Leu Ser Met Thr | |
| 20 25 30 | |
| Thr | |

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 9:

(i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 78 Aminosäuren

37

- (B) ART: Aminosäure
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 9:

```

Ala Ser Ala His Thr Ser His Pro Met Gln Gly Arg Thr Thr Pro Ser
1           5           10           15
Pro Glu Asp Ser Ser Trp Thr Asp Phe Phe Asn Pro Ile Ser His Pro
          20           25           30
Met Gly Arg Gly His Gln Ala Gly Arg Arg Met Asp Met Asp Ser Ser
          35           40           45
His Ser Thr Thr Leu Gln Pro Thr Ala Asn Pro Asn Thr Gly Leu Val
          50           55           60
Glu Asp Leu Asp Arg Thr Gly Pro Leu Ser Met Thr Thr Gln
65           70           75

```

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 10:

- (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:
 - (A) LÄNGE: 14 Aminosäuren
 - (B) ART: Aminosäure
 - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Peptid

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 10:

```

Gln Trp Phe Gly Asn Arg Trp His Glu Gly Tyr Arg Gln Thr
1           5           10

```

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 11:

- (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:
 - (A) LÄNGE: 27 Basenpaare
 - (B) ART: Nukleinsäure
 - (C) STRANGFORM: Einzel
 - (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNS zu mRNS

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 11:

CAGGCTGGGA GCCAAATGAA GAAAATG

27

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 12:

- (i) SEQUENZ CHARAKTERISTIKA:
 - (A) LÄNGE: 30 Basenpaare
 - (B) ART: Nukleinsäure
 - (C) STRANGFORM: Einzel
 - (D) TOPOLOGIE: linear

38

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNS zu mRNS

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 12:

TGATAAGGAA CGATTGACAT TAGAGTTGGA

30

Patentansprüche

1. Verfahren zur Diagnose und/oder Analyse von Tumoren, dadurch gekennzeichnet, daß dieses Verfahren auf dem Nachweis der Expression von mindestens einem variablen Exon des Gens CD44 beruht.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es auf dem immunologischen Nachweis von mindestens einem Epitop, das von einem variablen Exon des Gens CD44 kodiert wird, beruht.

3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es auf dem Nachweis einer Nukleinsäure, die für mindestens ein variables Exon des Gens CD44 spezifisch ist, beruht.

4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß das variable Exon Exon v5, v6, v7 oder v8 ist bzw. das Epitop von Exon v5, v6, v7 oder v8 kodiert wird.

5. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß das Exon v5 die Sequenz SEQ ID NO: 1,

(D) V D R N G T T A Y E G N W
(CAG)AT GTA GAC AGA AAT GGC ACC ACT GCT TAT GAA GGA AAC TGG

N P E A H P P L I H H E H H E
AAC CCA GAA GCA CAC CCT CCC CTC ATT CAC CAT GAG CAT CAT GAG

E E E T P H S T S T
GAA GAA GAG ACC CCA CAT TCT ACA AGC ACA A

oder eine allele Variante davon,

das Exon v6 die Sequenz SEQ ID NO: 3,

Q A T P S S T T E E T A T Q
TC CAG GCA ACT CCT AGT AGT ACA ACG GAA GAA ACA GCT ACC CAG

40

K E Q W F G N R W H E G Y R Q
AAG GAA CAG TGG TTT GGC AAC AGA TGG CAT GAG GGA TAT CGC CAA
T P R E D S H S T T G T A
5 ACA CCC AGA GAA GAC TCC CAT TCG ACA ACA GGG ACA GCT G

oder eine allele Variante davon,

das Exon v7 die Sequenz SEQ ID NO: 5,

10

A S A H T S H P M Q G R T T
CA GCC TCA GCT CAT ACC AGC CAT CCA ATG CAA GGA AGG ACA ACA
P S P E D S S W T D F F N P
15 CCA AGC CCA GAG GAC AGT TCC TGG ACT GAT TTC TTC AAC CCA
I S H P M G R G H Q A G R R
ATC TCA CAC CCC ATG GGA CGA GGT CAT CAA GCA GGA AGA AGG
20 M D
ATG G

oder eine allele Variante davon,

25 das Exon v8 die Sequenz SEQ ID NO: 7,

M D S S H S T T L Q P T A N
AT ATG GAC TCC AGT CAT AGT ACA ACG CTT CAG CCT ACT GCA AAT
P N T G L V E D L D R T G P
30 CCA AAC ACA GGT TTG GTG GAA GAT TTG GAC AGG ACA GGA CCT
L S M T T Q
CTT TCA ATG ACA ACG C

35

oder eine allele Variante davon hat.

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß die gleichzeitige Expression von v7 und v8 untersucht wird bzw. das Epitop von Exon v7 und Exon v8 gemeinsam kodiert wird.

5 7. Verfahren nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß die beiden Exons für die Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 9,

ASAHTSHPMQGRTPSPEDSSWTDFNPISHPMGRGHQAGRRMDMDSSHSTTLQPTANPNT
GLVEDLDRTGPLSMTTQ

10

oder eine eine allele Variante oder ein Fragment dieser Sequenz kodieren.

8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß der Tumor ein Mamma-, Magen-, Kolon- oder Zervixkarzinom ist.

15

9. Verwendung eines Antikörpers, der für variantes CD44 spezifisch ist, in einem Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 8.

20 10. Verwendung nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß der Antikörper spezifisch ist für ein Epitop, das durch eines der varianten Exons v5, v6, v7 oder v8 kodiert wird, oder das gemeinsam von den varianten Exons v7 und v8 kodiert wird.

25 11. Verwendung nach Anspruch 9 oder 10, dadurch gekennzeichnet, daß der Antikörper ein monoklonaler Antikörper, ein Fab- oder F(ab')₂-Fragment eines Immunglobulins, ein rekombinant hergestellter Antikörper, ein rekombinant hergestellter single-chain-Antikörper (scFv) oder ein chimärer bzw. humanisierter Antikörper ist.

12. Verwendung einer Nukleinsäure in einem Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 8.

30

13. Antikörper gegen variantes CD44, dadurch gekennzeichnet, daß er gegen ein Epitop gerichtet ist, das von Exon v5 kodiert wird.

35 14. Antikörper nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß das Epitop in der Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 2,

DVDRNGTTAYEGNWNPEAHPPLIHHEHHEEEETPHSTST

oder einer allelen Variante dieser Sequenz enthalten ist.

15. Antikörper gegen variantes CD44, dadurch gekennzeichnet, daß er gegen ein Epitop gerichtet ist, das von Exon v6 kodiert wird.

5

16. Antikörper nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß das Epitop in der Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 4,

QATPSSTTEETATQKEQWFGNRWHEGYRQTPREDSSHSTTGTA

10

oder einer allelen Variante dieser Sequenz enthalten ist.

17. Antikörper nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß das Epitop in der Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 10,

15

QWFGNRWHEGYRQT

oder einer allelen Variante dieser Sequenz enthalten ist.

20

18. Antikörper gegen variantes CD44, dadurch gekennzeichnet, daß er gegen ein Epitop gerichtet ist, das von den Exons v7 und v8 gemeinsam kodiert wird.

19. Antikörper nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, daß er gegen ein Epitop gerichtet ist, das in der Aminosäuresequenz SEQ ID NO: 9,

25

ASAHTSHPMQGRTPSPEDSSWTDFFNPISHPMGRGHQAGRRMDMDSSHSTTLQPTANPNT
GLVEDLDRTGPLSMTTQ

oder einer allelen Variante oder einem Fragment dieser Sequenz enthalten ist.

30

20. Antikörper nach einem der Ansprüche 13 bis 19, dadurch gekennzeichnet, daß er monoklonal ist.

21. Antikörper nach einem der Ansprüche 13 bis 20, dadurch gekennzeichnet, daß er ein Fab- oder F(ab')₂-Fragment eines Immunglobulins, ein rekombinant hergestellter single-chain-Antikörper (scFv) oder ein chimärer bzw. humanisierter Antikörper ist.

35

22. Verwendung eines Antikörpers gemäß einem der Ansprüche 13 bis 21 zur Diagnose und/oder Analyse von Tumoren.

23. Verwendung nach Anspruch 22, dadurch gekennzeichnet, daß der Tumor ein
5 Mamma-, Magen-, Kolon- oder Zervixkarzinom ist.

24. Verwendung eines Antikörpers gemäß einem der Ansprüche 13 bis 17 bzw. 20 oder 21 zur Diagnose und/oder Analyse von Mammakarzinomen.

10 25. Verwendung eines Antikörpers gemäß einem der Ansprüche 13 bis 17 bzw. 20 oder 21 zur Diagnose und/oder Analyse von Magenkarzinomen.

26. Verwendung eines Antikörpers gemäß einem der Ansprüche 13 bis 17 bzw. 20 oder 21 zur Diagnose und/oder Analyse von Kolonkarzinomen.

15

27. Verwendung eines Antikörpers gemäß einem der Ansprüche 18 bis 21 zur Diagnose und/oder Analyse von Zervixkarzinomen.

28. Verwendung eines Antikörpers gemäß einem der Ansprüche 13 bis 21 zur Herstellung eines Mittels für die Diagnose und/oder Analyse von Tumoren *in vivo*.
20

29. Verfahren zur Herstellung eines Antikörpers gemäß einem der Ansprüche 13 bis 20, dadurch gekennzeichnet, daß ein rekombinantes Polypeptid als Antigen verwendet wird, das eine Aminosäuresequenz enthält, die durch mindestens ein variantes Exon kodiert wird.

1/16

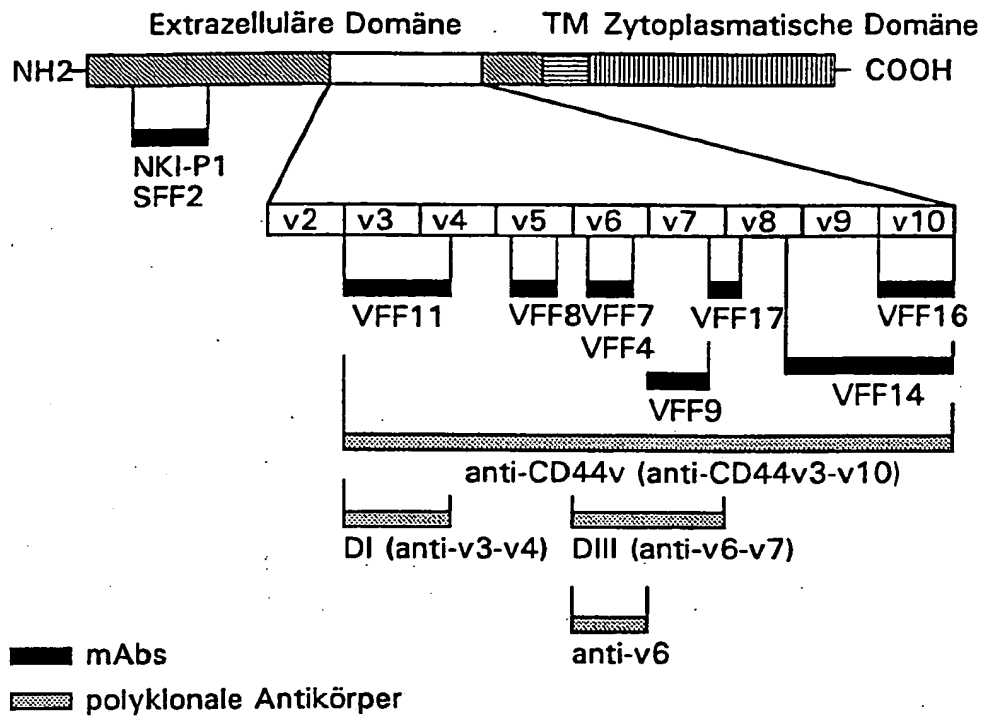


Fig. 1

2/16

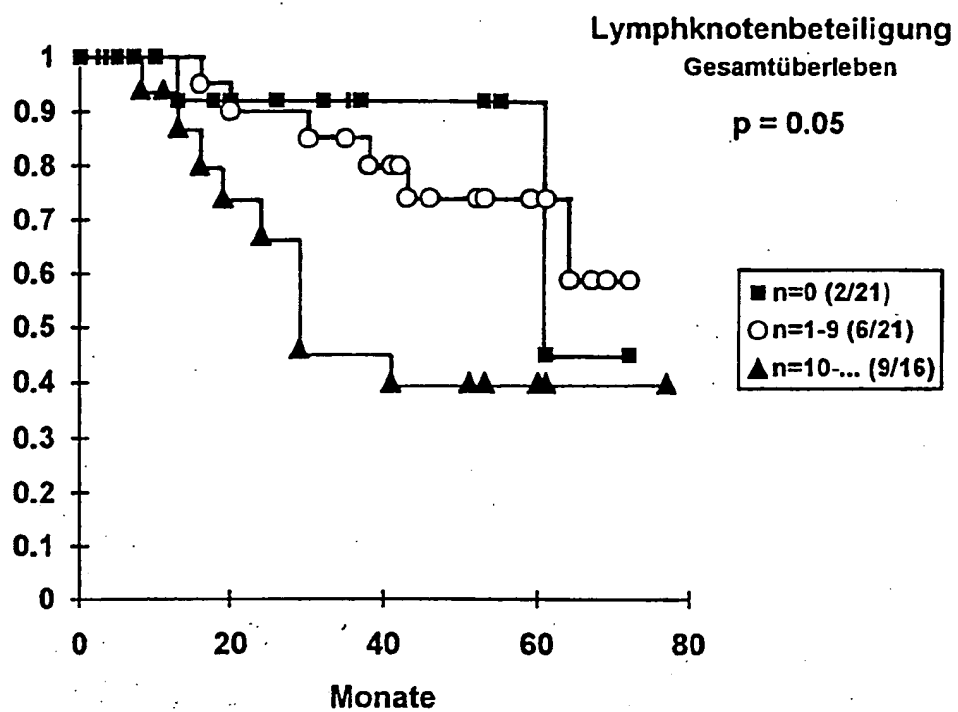


Fig. 2

3/16

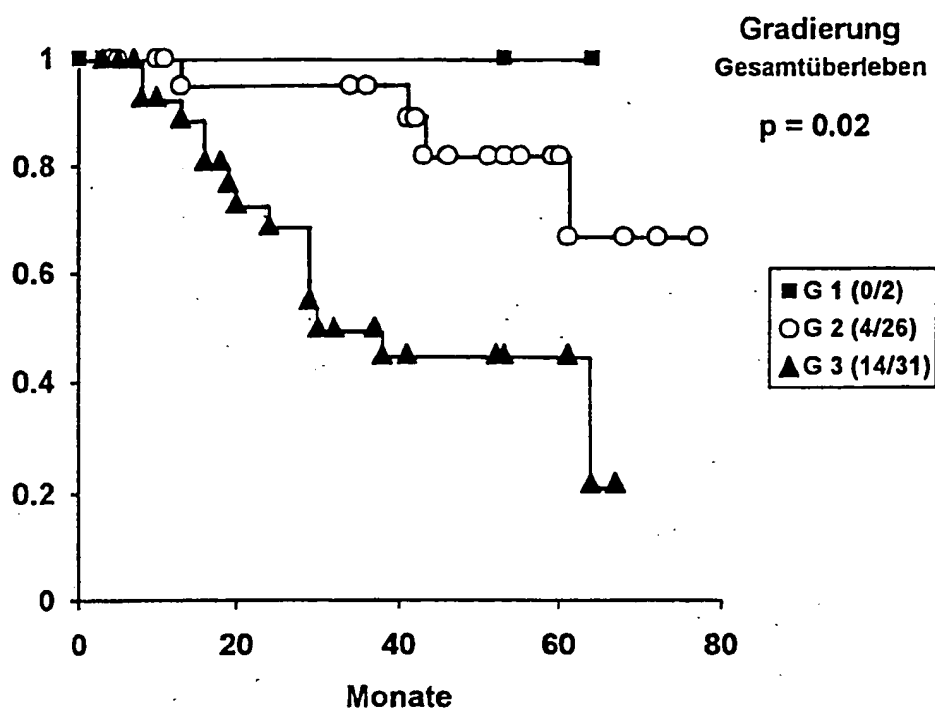
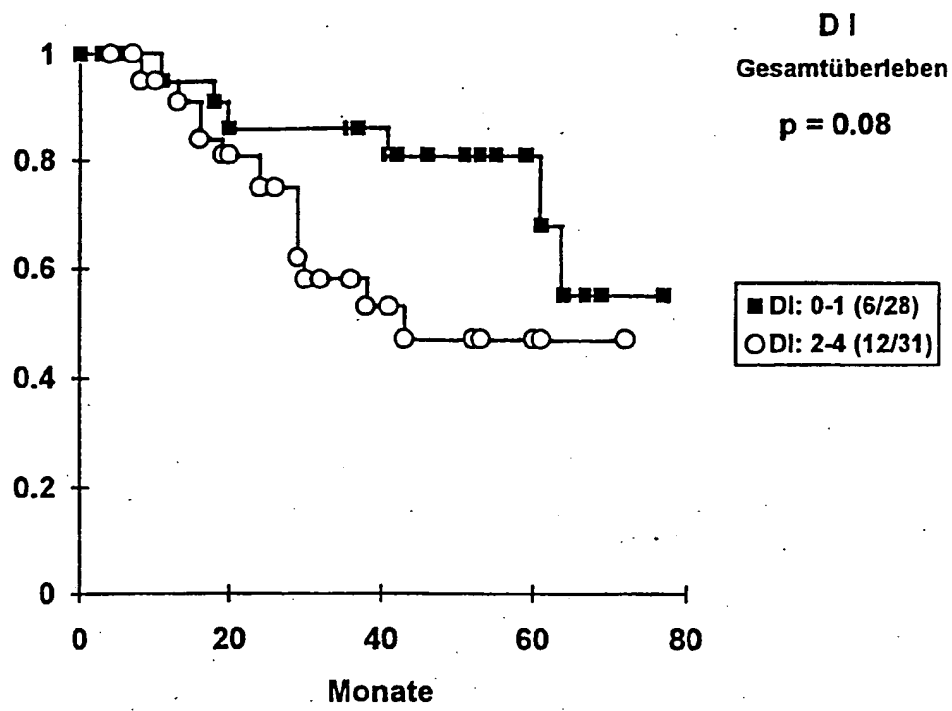


Fig. 3

4/16

*Fig. 4*

5/16

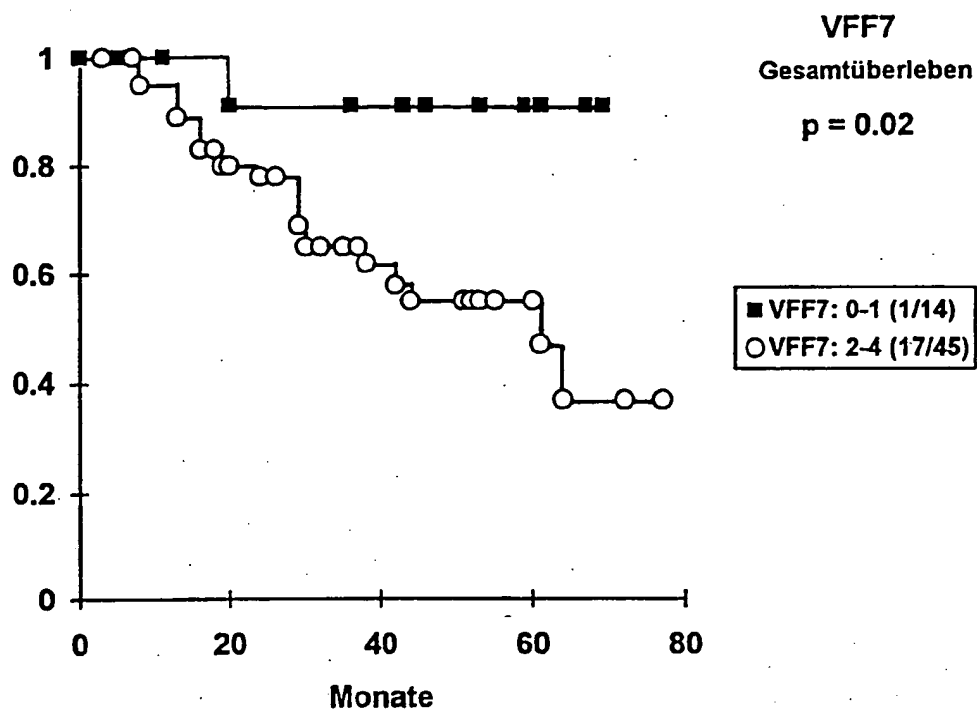


Fig. 5

6/16

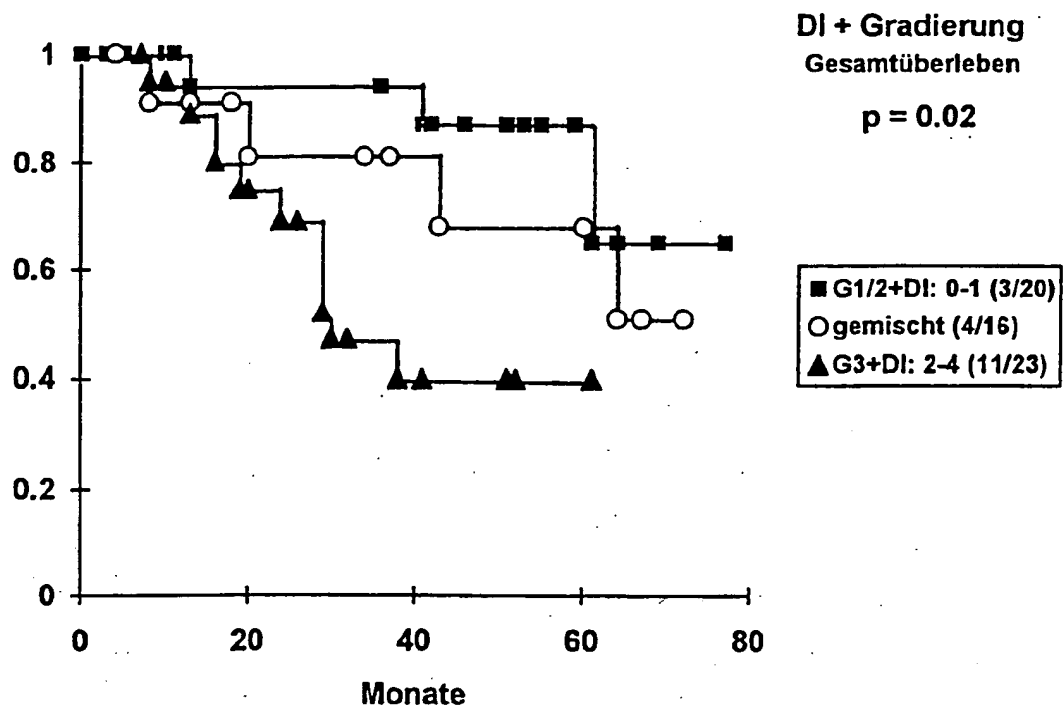


Fig. 6

7/16

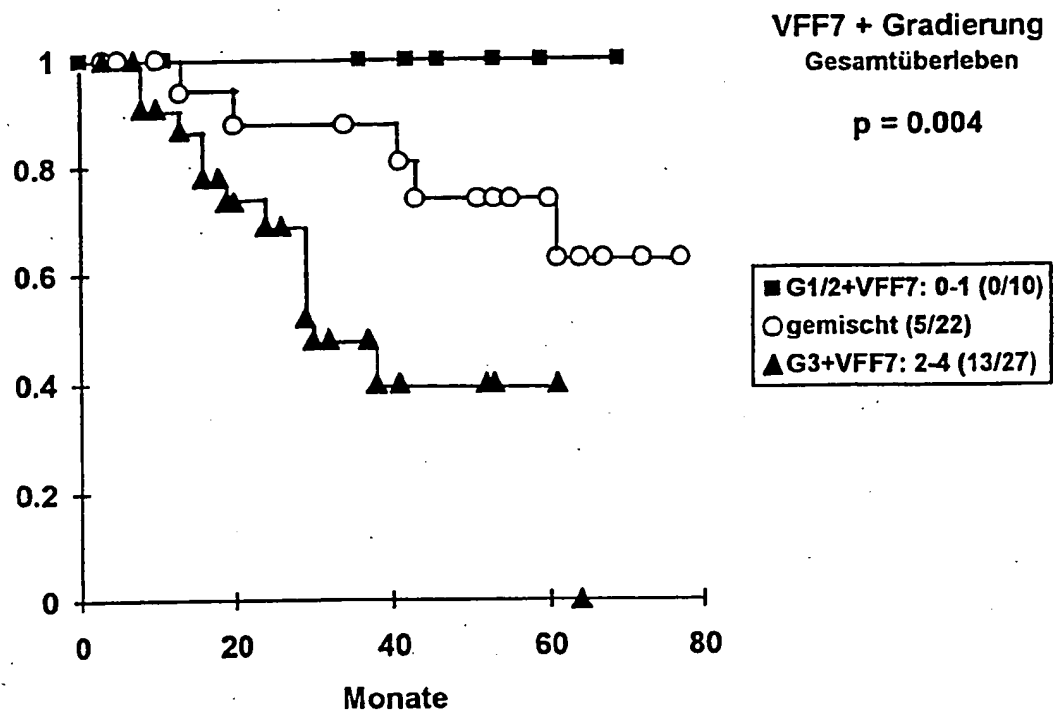


Fig. 7

8/16

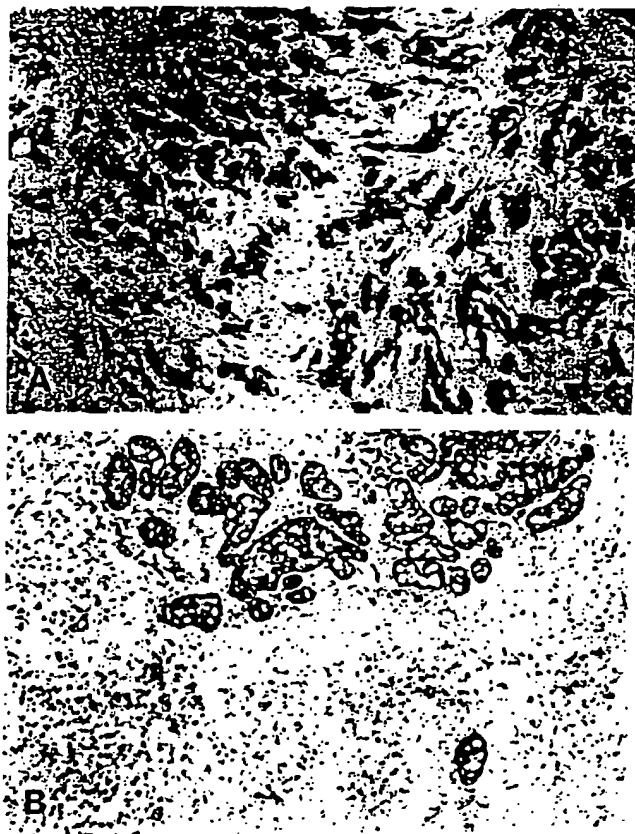
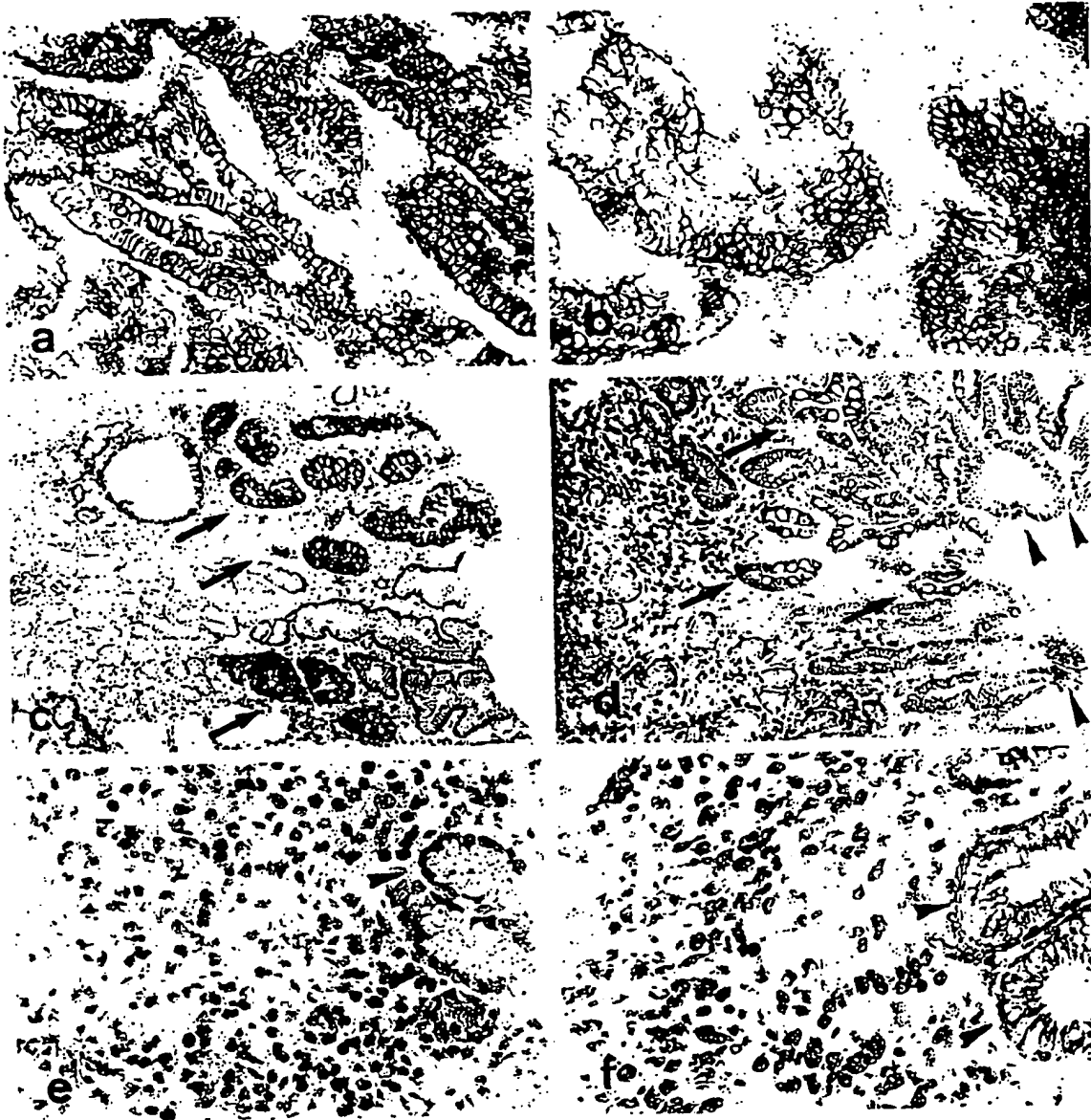
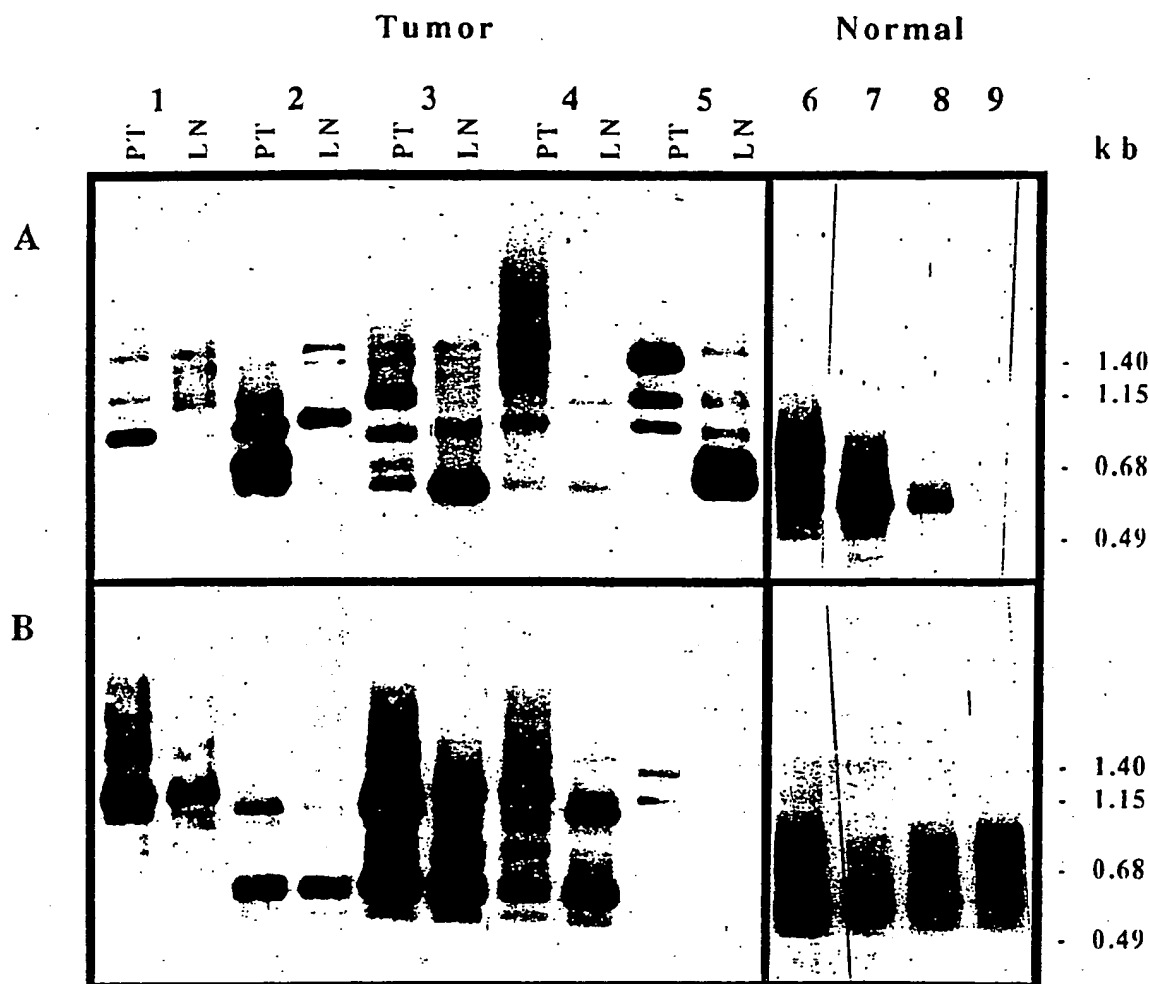


Fig. 8

ERSATZBLATT (REGEL 26)

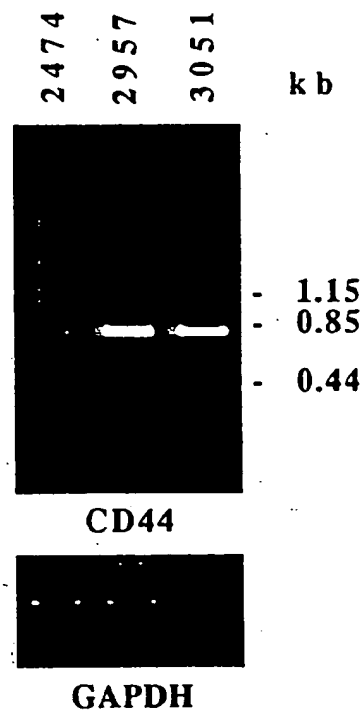
*Fig. 9*

10/16

*Fig. 10*

ERSATZBLATT (REGEL 26)

11/16

*Fig. 11*

12/16

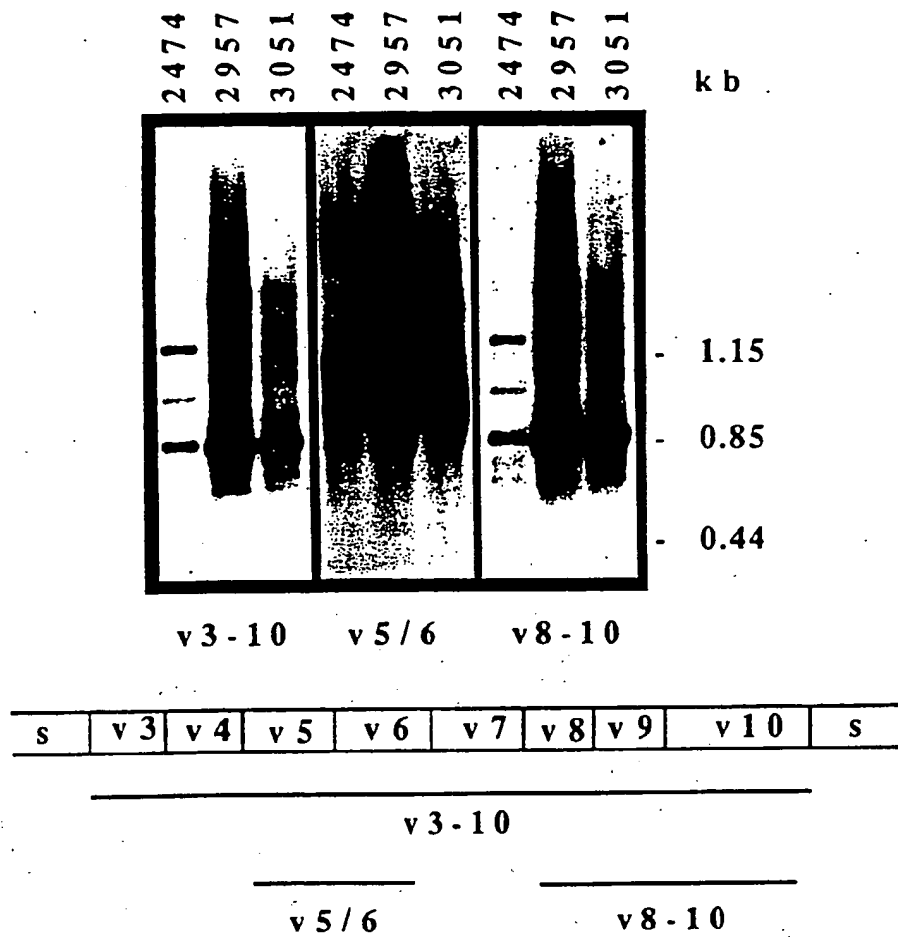


Fig. 12

ERSATZBLATT (REGEL 26)

13/16

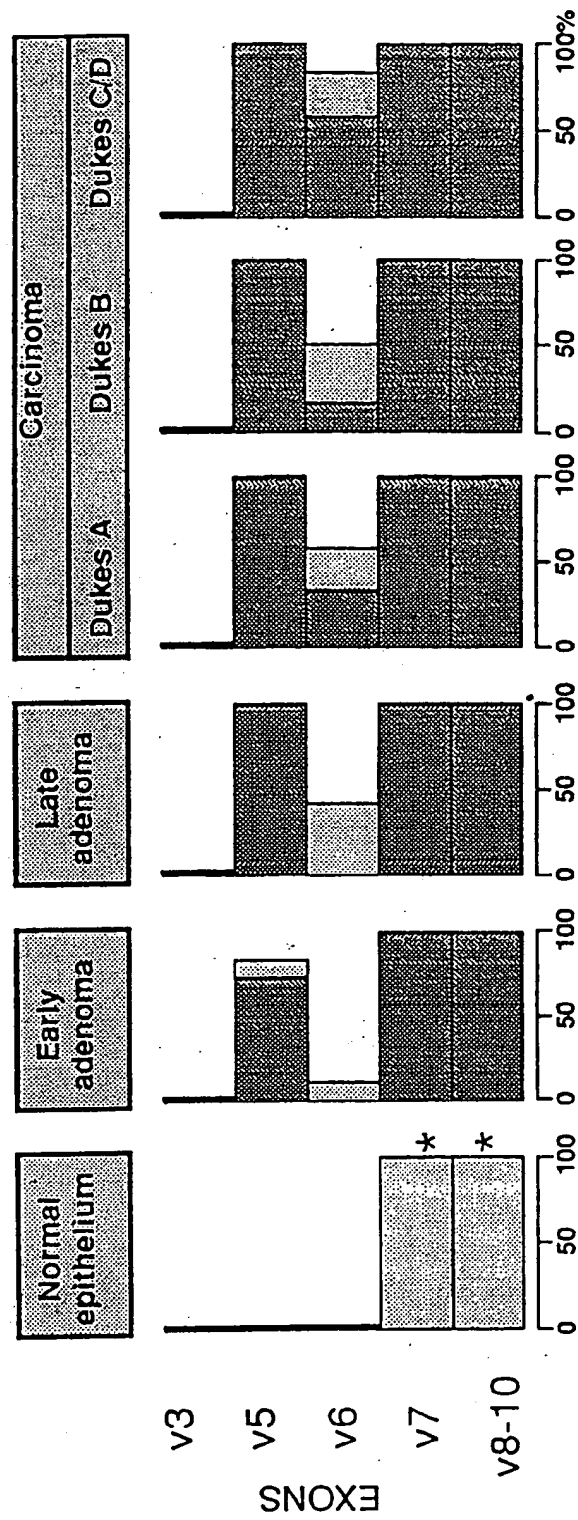
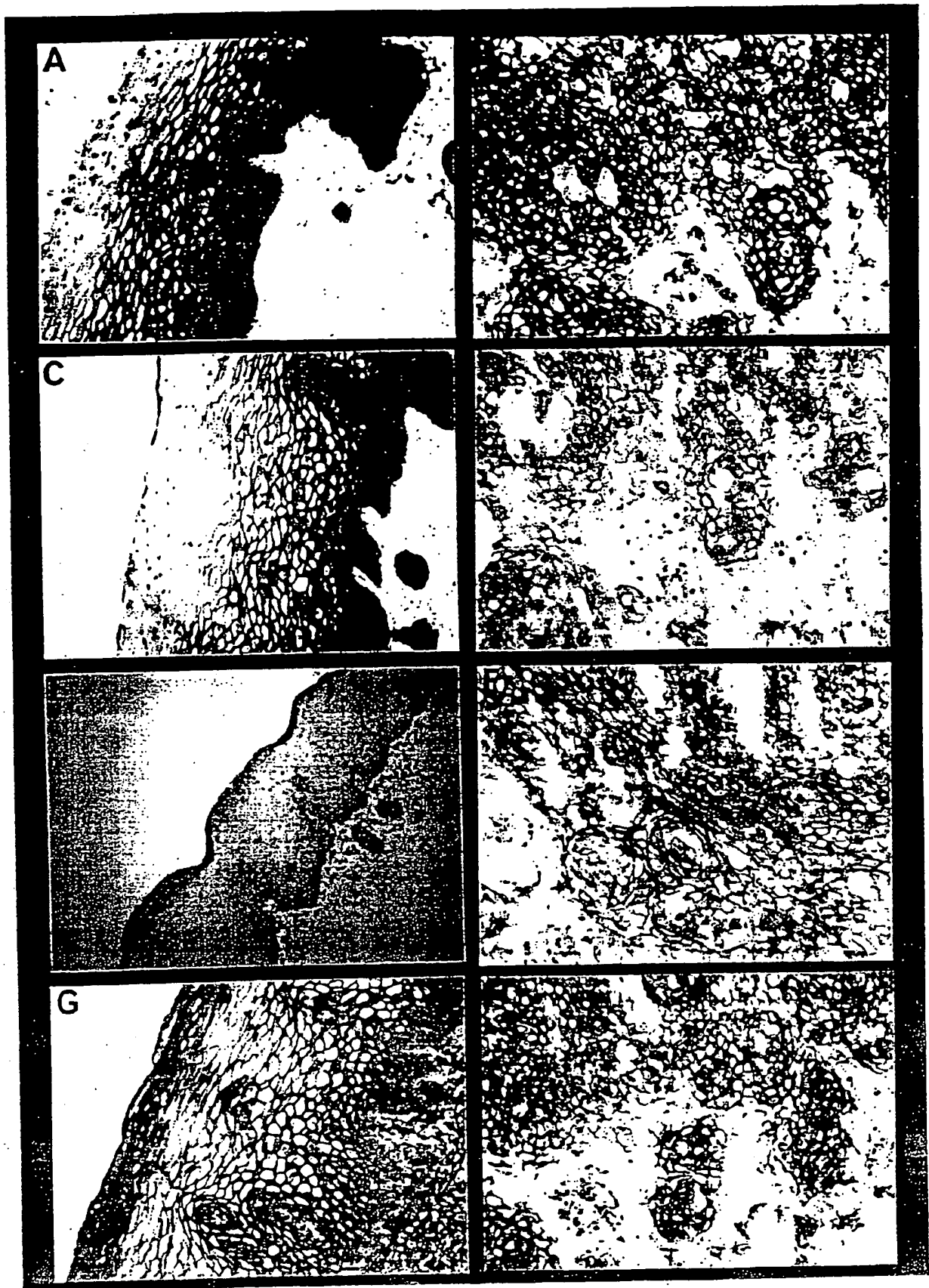


Fig. 13

*Fig. 14*

15/16

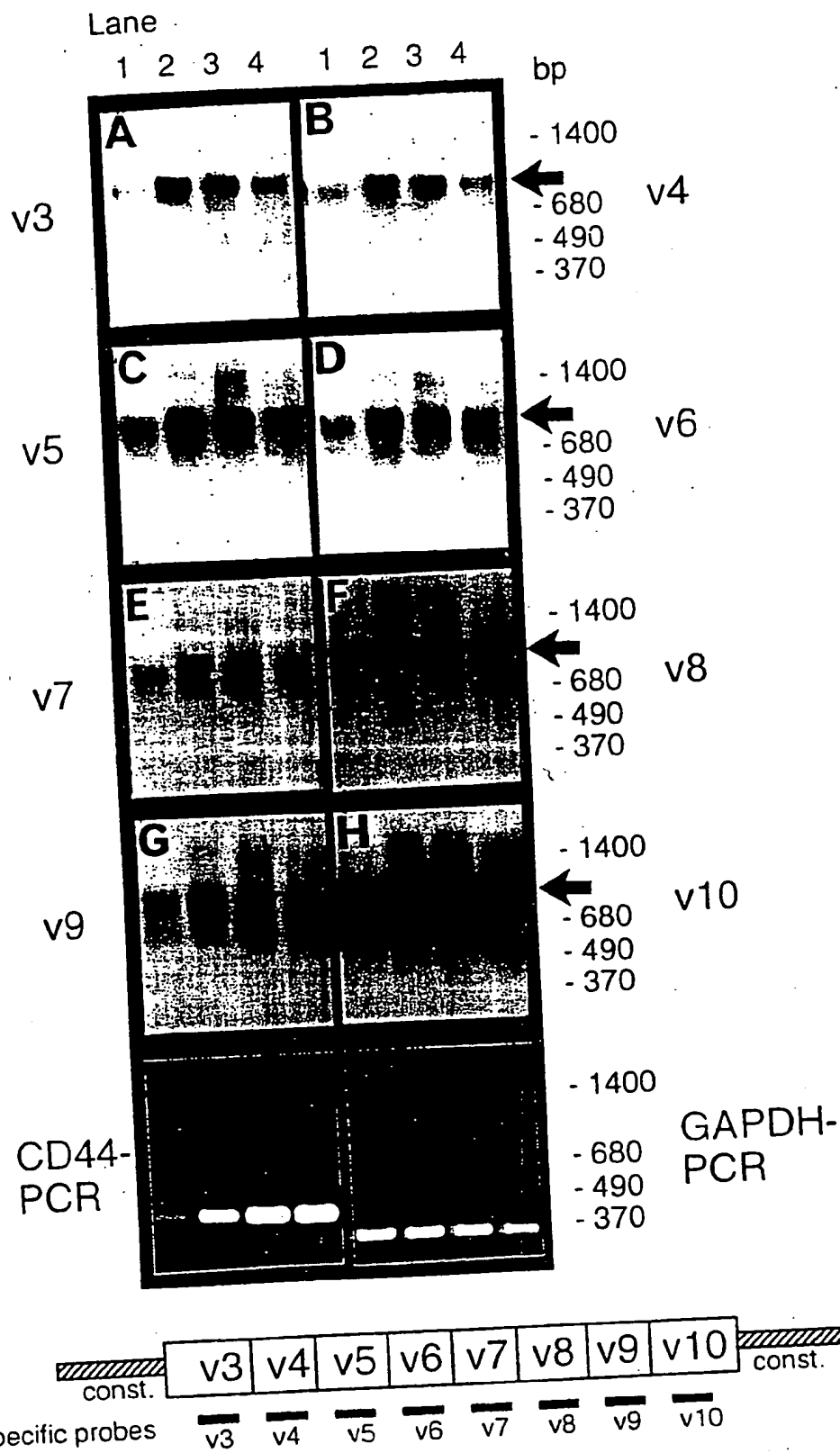


Fig. 15

ERSATZBLATT (REGEL 26)

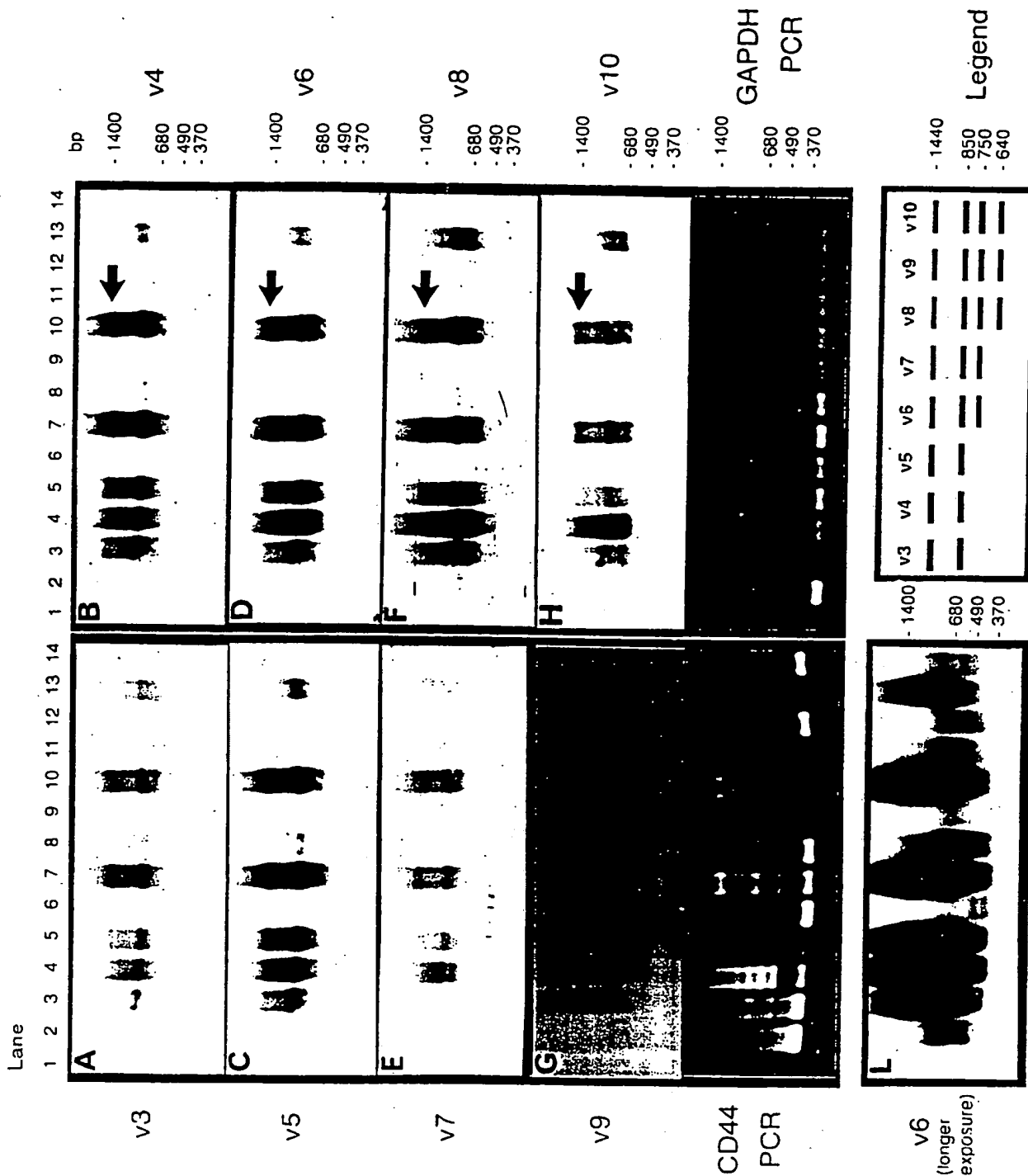


Fig. 16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int: onal Application No
PCT/EP 94/01952

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 5 G01N33/574 C12P21/08 C07K15/28 C12Q1/68 G01N33/577
A61K49/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 5 G01N C07K C12P C12Q A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|------------|--|-----------------------|
| X | JOURNAL OF CELL BIOLOGY, vol.120, no.1, January 1993, NEW YORK, NY, US pages 227 - 233 KARL-HEINZ HEIDER ET AL. 'A Human Homologue of the Rat Metastasis-associated Variant of CD44 Is Expressed in Colorectal Carcinomas and Adenomatous Polyps' cited in the application see the whole document | 1-5,8-12 |
| A | see the whole document cited in the application --- -/-- | 13-23, 26,28 |

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

13 October 1994

Date of mailing of the international search report

28.10.94

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Döpfer, K-P

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|------------|---|------------------------------|
| X | CANCER RESEARCH, vol.51, no.19, 1 October 1991, PHILADELPHIA, PA, US pages 5292 - 5297 MARTIN HOFFMANN ET AL. 'CD44 Splice Variants Confer Metastatic Behavior in Rats: Homologous Sequences Are Expressed in Human Tumor Cell Lines' cited in the application see the whole document | 1-5,8-12 |
| A | see figures 1,3,4,5; table 1 cited in the application --- | 7,13-28 |
| X | J. EXP. MED. (1993), 177(2), 443-55 CODEN: JEMEAV;ISSN: 0022-1007, 1993 SEITER, S. ET AL 'Prevention of tumor metastasis formation by anti- variant 44' see the whole document | 1-5, 8-12,15, 20-22,28 |
| A | see the whole document --- | 1-28 |
| X | JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE, vol.177, no.4, 1 April 1993, NEW YORK, NY, US pages 897 - 904 GERRIT KOOPMAN ET AL. 'Activated Human Lymphocytes and Aggressive Non-Hodgkin's Lymphomas Express a Homologue of the Rat Metastasis-associated Variant of CD44' cited in the application see the whole document | 1-5, 8-13,15, 20-22 |
| A | see the whole document cited in the application --- | 1-28 |
| X | WO,A,91 17248 (KERNFORSCHUNGSZENTRUM KARLSRUHE GMBH; UNIVERSITÄT KARLSRUHE U.A.) 14 November 1991 see the whole document | 1-3 |
| A | see the whole document --- | 1-28 |
| A | PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, vol.89, no.24, 15 December 1992, WASHINGTON US pages 12160 - 12164 GAVIN R. SCRETON ET AL. 'Genomic structure of DNA encoding the lymphocyte homing receptor CD44 reveals at least 12 alternatively spliced exons' cited in the application see the whole document --- | 1-29 |
| | --- -/-- | |

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category * | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|------------|---|--------------------------------|
| A | NUCLEIC ACIDS RESEARCH, vol.21, no.5, 11 March 1993, OXFORD, GB pages 1225 - 1229 CORNELIA TÖLG ET AL. 'Splicing choice from ten variant exons establishes CD44 variability' cited in the application see the whole document | 1-29 |
| P,X | --- J. CELL BIOL. (1994), 124(1-2), 71-82 CODEN: JCLBA3;ISSN: 0021-9525, 1994 MACKAY, CHARLES R. ET AL 'Expression and modulation of CD44 variant isoforms in humans' see page 71, left column, line 1 - page 73, right column, line 48 see page 74; figure 1 see page 77; table 1 see the whole document | 1-5, 9-12, 15, 20-22, 29 |
| P,A | --- see the whole document | 1-29 |
| P,X | WO,A,94 02633 (ISIS INNOVATION LIMITED) 3 February 1994 see the whole document | 1-5, 9-12, 15, 20-22, 29 |
| P,A | see the whole document ----- | 1-29 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 94/01952

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|---|---------------------|----------------------------|---------------------|
| WO-A-9117248 | 14-11-91 | DE-A- 4014510 | 14-11-91 |
| | | AT-T- 106943 | 15-06-94 |
| | | AU-B- 646858 | 10-03-94 |
| | | AU-A- 7565991 | 27-11-91 |
| | | DE-D- 59101889 | 14-07-94 |
| | | EP-A- 0531300 | 17-03-93 |
| | | JP-T- 5508309 | 25-11-93 |
| <hr/> | | | |
| WO-A-9402633 | 03-02-94 | WO-A- 9412631 | 09-06-94 |
| <hr/> | | | |

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 5 G01N33/574 C12P21/08 C07K15/28 C12Q1/68 G01N33/577
A61K49/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 5 G01N C07K C12P C12Q A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile | Betr. Anspruch Nr. |
|------------|--|--------------------|
| X | JOURNAL OF CELL BIOLOGY, Bd.120, Nr.1, Januar 1993, NEW YORK, NY, US Seiten 227 - 233 KARL-HEINZ HEIDER ET AL. 'A Human Homologue of the Rat Metastasis-associated Variant of CD44 Is Expressed in Colorectal Carcinomas and Adenomatous Polyps' in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument in der Anmeldung erwähnt --- | 1-5,8-12 |
| A | | 13-23, 26,28 |

-/--

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

13. Oktober 1994

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

28. 10. 94

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Döpfer, K-P

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile | Betr. Anspruch Nr. |
|-----------|--|------------------------------|
| X | CANCER RESEARCH, Bd.51, Nr.19, 1. Oktober 1991, PHILADELPHIA, PA, US Seiten 5292 - 5297 MARTIN HOFFMANN ET AL. 'CD44 Splice Variants Confer Metastatic Behavior in Rats: Homologous Sequences Are Expressed in Human Tumor Cell Lines' in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument | 1-5,8-12 |
| A | siehe Abbildungen 1,3,4,5; Tabelle 1 in der Anmeldung erwähnt --- | 7,13-28 |
| X | J. EXP. MED. (1993), 177(2), 443-55 CODEN: JEMEAV;ISSN: 0022-1007, 1993 SEITER, S. ET AL 'Prevention of tumor metastasis formation by anti- variant 44' siehe das ganze Dokument | 1-5, 8-12,15, 20-22,28 |
| A | siehe das ganze Dokument --- | 1-28 |
| X | JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE, Bd.177, Nr.4, 1. April 1993, NEW YORK, NY, US Seiten 897 - 904 GERRIT KOOPMAN ET AL. 'Activated Human Lymphocytes and Aggressive Non-Hodgkin's Lymphomas Express a Homologue of the Rat Metastasis-associated Variant of CD44' in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument | 1-5, 8-13,15, 20-22 |
| A | siehe das ganze Dokument in der Anmeldung erwähnt --- | 1-28 |
| X | WO,A,91 17248 (KERNFORSCHUNGSZENTRUM KARLSRUHE GMBH; UNIVERSITÄT KARLSRUHE U.A.) 14. November 1991 siehe das ganze Dokument | 1-3 |
| A | siehe das ganze Dokument --- | 1-28 |
| A | PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, Bd.89, Nr.24, 15. Dezember 1992, WASHINGTON US Seiten 12160 - 12164 GAVIN R. SCREATION ET AL. 'Genomic structure of DNA encoding the lymphocyte homing receptor CD44 reveals at least 12 alternatively spliced exons' in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument --- | 1-29 |

-/--

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile | Betr. Anspruch Nr. |
|------------|---|------------------------------|
| A | NUCLEIC ACIDS RESEARCH, Bd.21, Nr.5, 11. März 1993, OXFORD, GB Seiten 1225 - 1229 CORNELIA TÖLG ET AL. 'Splicing choice from ten variant exons establishes CD44 variability' in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument ---- | 1-29 |
| P,X | J. CELL BIOL. (1994), 124(1-2), 71-82 CODEN: JCLBA3;ISSN: 0021-9525, 1994 MACKAY, CHARLES R. ET AL 'Expression and modulation of CD44 variant isoforms in humans' siehe Seite 71, linke Spalte, Zeile 1 - Seite 73, rechte Spalte, Zeile 48 siehe Seite 74; Abbildung 1 siehe Seite 77; Tabelle 1 siehe das ganze Dokument ---- | 1-5, 9-12,15, 20-22,29 |
| P,A | ---- | 1-29 |
| P,X | WO,A,94 02633 (ISIS INNOVATION LIMITED) 3. Februar 1994 siehe das ganze Dokument siehe das ganze Dokument ----- | 1-5, 9-12,15, 20-22,29 |
| P,A | ----- | 1-29 |

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichung, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 94/01952

| Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument | Datum der Veröffentlichung | Mitglied(er) der Patentfamilie | Datum der Veröffentlichung |
|--|-------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------|
| WO-A-9117248 | 14-11-91 | DE-A- 4014510 | 14-11-91 |
| | | AT-T- 106943 | 15-06-94 |
| | | AU-B- 646858 | 10-03-94 |
| | | AU-A- 7565991 | 27-11-91 |
| | | DE-D- 59101889 | 14-07-94 |
| | | EP-A- 0531300 | 17-03-93 |
| | | JP-T- 5508309 | 25-11-93 |
| <hr/> | | | |
| WO-A-9402633 | 03-02-94 | WO-A- 9412631 | 09-06-94 |
| <hr/> | | | |